

Ispitivanje prisutnosti mikotoksina 5-metoksisterigmatocistina u pivu metodom tankoslojne kromatografije

Kožić, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:297330>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Hrvoje Kožić

**Ispitivanje prisutnosti mikotoksina 5-
metoksisterigmatocistina u pivu metodom
tankoslojne kromatografije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Jakšić.

Srdačno zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, strpljenju i angažmanu. Veliko hvala upućujem i svojim prijateljima i svojoj obitelji, koji su mi bili izvor velike podrške tijekom pisanja diplomskog rada, kao i tijekom cijelog studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Mikotoksini	1
1.2 Struktura, svojstva i metabolizam 5-metoksisterigmatocistina.....	2
1.3. Toksičnost 5-metoksisterigmatocistina	3
1.4. Plijesni proizvođači 5-metoksisterigmatocistina.....	5
1.5. Pojavnost 5-metoksisterigmatocistina.....	6
1.6. Analitičke metode za detekciju	7
1.7. Pivo i mikotoksini	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Radni instrumenti	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Priprema ekstrakata	12
3.2.2. Ispitivanje prisutnosti 5-MET u ekstraktima piva metodom tankoslojne kromatografije	13
3.3. Statistička analiza.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. LITERATURA	33
7. SAŽETAK	40
8. SUMMARY	41
Temeljna dokumentacijska kartica	42
Basic documentation card.....	43

1. UVOD

1.1 Mikotoksini

Mikotoksini su produkti sekundarnog metabolizma gljivica, koje ih proizvode tijekom kolonizacije razolikih supstrata. Mogu izazvati toksičnost i alimentarnim i inhalacijskim unosom (Tuomi i sur., 2000; Pang i sur., 1988; Creasia i sur., 1987).

Mikotoksini od velikog agroekonomskog i javnozdravstvenog značaja uključuju aflatoksine, okratoksin A, patulin, trihotecene, zearalenon, fumonizine, tremorgene toksine i ergot-alkaloide (Hussein i Brassel, 2001). Glavni proizvođači mikotoksina su plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Banfalvi, 2021).

Mikotoksine mogu proizvoditi i primarni/sekundarni kolonizatori (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. – plijesni koje mogu rasti pri nižem aktivitetu vode), i tercijarni kolonizatori (*Stachybotrys* spp., *Chaetomium* spp.).

Zdravstveno štetni učinci različitih mikotoksina na ljude i životinje uključuju karcinogenost, teratogenost, imunotoksičnost, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i reproduktivnu toksičnost (Creppy, 2002). Radi se o stabilnim spojevima, čija je pojava zabilježena u raznolikim uvjetima proizvodnje, obrade i skladištenja hrane (Bullerman i Bianchini, 2007).

Mikotoksini su, među ostalim, detektirani i u prehrambenim proizvodima. Zabilježeni su u žitaricama, kikirikiju, mlijeku i mliječnim proizvodima, kavi, vinu, pivu, svježem i sušenom voću, povrću i orašastim plodovima (Pascari i sur., 2018). Biosinteza mikotoksina ovisi o nizu faktora: vlažnosti proizvoda, aktivitetu vode, temperaturi, pH vrijednosti, sastavu matriksa hrane, fizičkim oštećenjima na hrani, i prisutnosti spora. (Pleadin i sur., 2015; Sforza i sur., 2006) Prehrambene sirovine mogu biti kontaminirane mikotoksinima na polju, tijekom žetve/berbe, transporta i skladištenja (Coffey i sur., 2009).

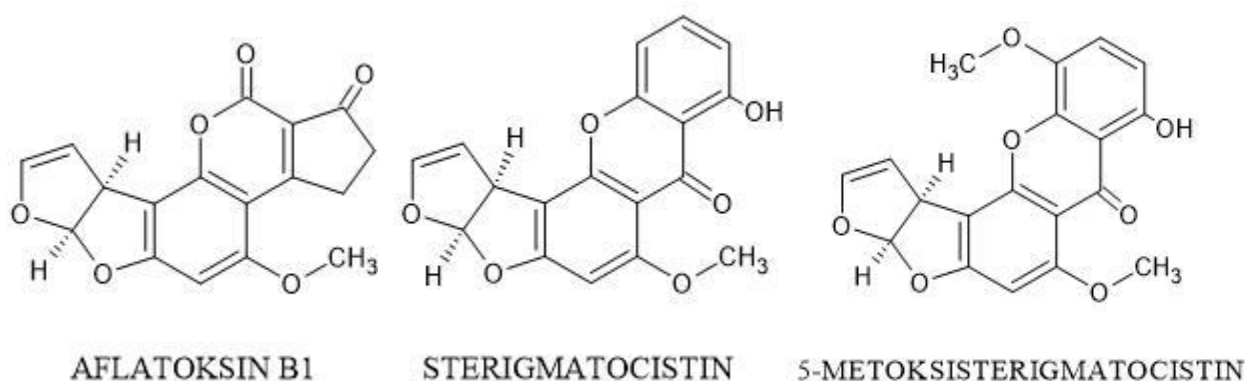
Postoji veliki broj različitih podjela mikotoksina. Jedna od tih podjela tiče se njihova podrijetla, odnosno mjesta kontaminacije. Tako postoje mikotoksini povezani s poljima (engl *field mycotoxins*), koje uglavnom proizvode plijesni iz roda *Fusarium*. Ti mikotoksini su deoksinivalenol, zearalenon, fumonizini i toksini T-2 i HT-2. Druga su vrsta mikotoksini povezani

sa skladištima (engl *storage mycotoxins*). Među njima su najčešći aflatoksini i okratoksini (Pleadin i sur., 2019).

Aflatoksini (AF) se ističu kao najistraživaniji i javnozdravstveno najrelevantniji mikotoksini. Jedan od njih, aflatoxin B1 (AFB1), smatra se najpotentnijim prirodno stvorenim humanim karcinogenom. (IARC, 1993).

Metabolički i strukturno povezani, no slabije istraženi mikotoksini su sterigmatocistin (STC) i 5-metoksisterigmatocistin (5-MET). Posebno za 5-MET postoji malo literature - nije izvedeno puno istraživanja o njegovoj toksičnosti i pojavnosti u različitim supstratima.

STC je u nekim plijesnima (*Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*) prekursor u biosintezi AF, dok je u drugima (*Aspergillus versicolor*) konačni produkt biosinteze (Frisvad i sur., 2005; Brown i sur., 1996). 5-MET je derivat STC strukturno vrlo nalik na njega (razlika je samo u jednoj – OCH₃ skupini, na C11 atomu, slika 1). Nije supstrat za O-metiltransferaze koje STC pretvaraju u AF. Nije razjašnjeno koja je tačno i postoji li metabolička relacija 5-MET s STC ili AF (Yabe i sur., 1989).



Slika 1. Usporedba strukture aflatoksina B1, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina (nacrtano u programu ChemSketch)

1.2 Struktura, svojstva i metabolizam 5-metoksisterigmatocistina

5-MET je izoliran u krutom stanju u obliku igličastih kristala blijedožute boje. Molekulska formula mu je C₁₉H₁₄O₇, a molekulska masa mu je 354,07. Talište mu je na 223 °C. Maksimum apsorpcije

u UV spektru pokazuje na valnim duljinama od 232, 248, 279 i 331 nm (Shao i sur., 2007; Cox i Cole, 1977).

5-MET je mikotoksin poliketidne strukture. U strukturi ima bisfuranski i ksantonski dio. Generalno, bisfuranski prstenski sustav u strukturi smatra se odgovornim za toksične učinke mikotoksina iz skupine AF i STC (Wang i Groopman, 1999; Rodricks, 1969). Za citotoksičnost mikotoksina odgovoran je niz hidroksilnih skupina u strukturi, a za karcinogena svojstva odgovorna je polienska struktura i kumulativna prisutnost ketonskih funkcionalnih skupina (Banfalvi, 2021).

Za aktivnost 5-MET-a uz intaktan bisfuranski prsten ključna je i prisutnost dvostruke veze u terminalnom furanskom prstenu. U ksantonski dio molekule moguće je dodati neke supstituente bez da se aktivnost značajno promijeni (Essery i sur., 1976.).

Općenito, STC i njegovi derivati (poput 5-MET) koji imaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma su mutageni, dok derivati u kojima je ta veza zasićena nemaju mutageni učinak (Mori i sur., 1986). Čini se da je ta C2-C3 dvostruka veza ključna za stvaranje reaktivnih metabolita i vezanje na DNA (Busby i Wogan, 1984).

Metabolizam i biosinteza 5-MET-a nije sasvim razjašnjena. Strukturno srodan STC se CYP sustavom enzima metabolizira u toksični epoksid. Uz CYP u tom procesu u epitelnim stanicama dišnog sustava mogu sudjelovati i UDP-glukuronoziltransferaze i sulfotransferaze. Nije detektiran nikakav takav analogan reaktivni metabolit kod 5-MET. Međutim, 5-MET se metabolizira konjugacijom - sulfokonjugacijom i konjugacijom s glukuronidima. Prije II. faze metabolizma, u I. fazi CYP1A1 od 5-MET stvara hidroksinor-metabolit, nor-metabolit i dihidroksi-metabolit. CYP1A2 katalizira nastanak monohidroksi-metabolita. Također, 5-MET povećava razine CYP1A1 mRNA. Objašnjenje za to možda leži u tome što kao planarni policiklički spoj, 5-MET može biti ligand AhR receptora (Cabaret i sur., 2013.) Isti rad ističe da STC stvara adukt s GSH oblikom glutaciona (što upućuje na reaktivnost metabolita), dok kod 5-MET to nije slučaj. Dakle, za razliku od STC, za 5-MET nije zabilježeno da stvara reaktivni epoksidni intermedijer.

1.3. Toksičnost 5-metoksisterigmatocistina

Mutagenost 5-MET utvrđena je Amesovim testom, na TA100 soju *Salmonelle typhimurium* (Mori, 1986). Njegova citotoksičnost i genotoksičnost utvrđena je na stanicama humanog

adenokarcinoma pluća A549 (Jakšić i sur., 2012). Genotoksični potencijal utvrđen je testom mikronukleusa i alkalnim komet testom. Test mikronukleusa detektira mutacije u DNA, a alkalni komet test je osjetljiva metoda za detekciju jednostrukih i dvostrukih lomova DNA (Jakšić i sur., 2012).

5-MET je i sam i u kombinaciji s STC-om citotoksičan i genotoksičan i za A549 i za Hepg2 stanice (stanice karcinoma jetre). Uz to, pokazano je da 5-MET i STC aktiviraju Chk2 protein izmjenjujući njegovu fosforilaciju. Chk2 protein je serin-treonin kinaza uključena u širenje signala oštećenja DNA fosforilacijom efektorskih proteina uključenih u popravak DNA, regulaciju staničnog ciklusa, signaliziranje preko proteina p53 i apoptozu. Kombinacije STC i 5-MET u istom su radu pokazale učinak koji je bio aditivni ili antagonizirajući, ovisno o primijenjenoj koncentraciji STC. Odsutnost i niska razina aktivacije *checkpoint* proteina tijekom produžene izloženosti necitotoksičnim koncentracijama STC-a i 5-MET-a mogu upućivati na povezanost 5-MET sa staničnom proliferacijom i karcinogenezom (Dabelić i sur., 2021).

Jakšić i sur. (2020) su proveli istraživanje u kojem su STC i 5-MET intratrahealno uneseni u Wistar štakore. Rezultati sugeriraju da je STC odgovorniji za jednostruke lomove DNA, a 5-MET za dvostruke. Rezultati također upućuju na to da STC i 5-MET primijenjeni zajedno imaju antagonizirajući genotoksični učinak. Također, u istom je radu pokazano da je 5-MET, u koncentracijama koje odgovaraju onima u kojima je prisutan u vlažnim prostorima, imao negativne imunomodulatorne učinke – smanjio je koncentraciju TNF- α i IL-6 u bronhoalveolarnoj tekućini Wistar štakora.

Bradner i sur. 1975. su pokazali da 5-MET može imati antitumorsku aktivnost, utoliko što je inhibirao stanice transplantirane mišje leukemije P-388 i L-1210. Ovaj potencijalni antitumorski učinak može samo još dodatno potvrditi da 5-MET utječe na DNA i da može biti genotoksičan. Prema tom radu, moguće je da 5-MET uzrokuje promjene u metabolizmu nukleinskih kiselina.

Cao i sur. 2022. su pronašli 5-MET, zajedno sa STC-om, u antarktičkom soju *Aspergillus sp.* SF-7402. Evaluirao se njihov antineuropalni učinak, na lipopolisaharidom stimuliranim BV2 stanicama (stanicama mikroglije). Ispostavilo se da 5-MET može inhibirati proizvodnju NO-a, te smanjiti translokaciju NF- κ B u jezgru.

Mehanizam kojim 5-MET ostvaruje navedene učinke te mehanizam kojim se 5-MET aktivira nisu poznati. Strukturno srodan STC, kao i AFB1, aktivira se u jetri CYP-om u epoksid koji stvara adukte s gvaninom na DNA (EFSA, 2013). Također, moguće je da stupa i u nekovalentnu interakciju s DNA interkalacijom (Jakšić i sur., 2019). STC je klasificiran kao 2B karcinogen, koji je doveden u vezu s hemangiosarkomom jetre, hepatocelularnim karcinomom i pulmonarnim adenomom (IARC, 1976). In vitro je pokazao toksične učinke na HepG2 stanicama, A549 stanicama, Het-1A stanicama (stanicama epitela jednjaka) i BEAS-2B stanicama (stanicama plućnog epitela) (Dabelić i sur., 2021).

Mehanizam genotoksičnosti STC-a u linijama stanica pluća povezan je s prekidom staničnog ciklusa u G2/S i G2/M fazi – STC mijenja ekspresiju ciklina i o ciklinu ovisnih kinaza (Huang i sur., 2014). AFB1 može utjecati na sintezu DNA, s DNA stvarati adukte, i pojačavati uvjete oksidacijskog stresa (Benkerroum, 2020). Mehanizam toksičnosti 5-MET-a nije poznat, no s obzirom na sličnosti u strukturi, moguće je da je sličan mehanizmu toksičnosti STC i AFB1.

Ipak, iako se STC i 5-MET strukturno razlikuju samo u prisutnosti jedne –OCH₃ skupine, u prethodno navedenim radovima značajno su se razlikovali po svojoj toksičnosti. STC je bio 10 puta toksičniji za A549 i Hepg2 stanice od 5-MET. Metoksi-skupina u 5-MET je elektron-donorska grupa koja može aktivirati hidroksilnu skupinu 5-MET i tako poboljšati njegovu biodostupnost u odnosu na STC, a samim time i promijeniti njegova svojstva i učinak.

1.4. Plijesni proizvođači 5-metoksisterigmatocistina

5-MET, kao i STC, proizvode plijesni iz roda *Aspergillus*. Vrste roda *Aspergillus* (aspergili) kao primarni kolonizatori mogu se prilagoditi uvjetima u kojima je aktivitet vode manji od 0,8 i tako rasti u vlažnim zatvorenim prostorima češće nego ostale vrste. (Šegvić Klarić i sur., 2007; Schulz i sur., 2004; Nielsen, 2003).

Među najčešće prisutne plijesni u zraku u zatvorenim prostorima ubrajaju se aspergili sekcije *Nidulantes* serije *Versicolores*. Oni mogu rasti na supstratima siromašnima nutrijentima te pri niskom aktivitetu vode. Također, imaju visoku brzinu rasta i vrlo otporne konidije. Mogu se prilagoditi i širokom rasponu temperature i pH (Chen i sur., 2016; Rank i sur. 2011; Nielsen i sur., 1999).

Upravo su aspergili sekcije *Nidulantes* serije *Versicolores* najčešći proizvođači 5-MET-a (Jakšić i sur., 2020). Uz 5-MET (i STC), te plijesni često proizvode druge toksične metabolite, koji uključuju ciklopiazonsku kiselinu, nidulotoksin, averufin, versikonol i versikolorine A, B i C (Piontek i sur., 2016).

Osim u zatvorenim prostorima, zbog mogućnosti toleriranja različitih okolišnih uvjeta, *A. versicolores* su općenito ubikvitarne u prirodi. Često su prisutne u tlu, na biljkama i u otpacima, na žitaricama te na hrani koja truli. Proizvode proteolitičke enzime. Optimalna temperatura za njihov rast iznosi između 20 i 30 °C, a konidije im germiniraju na temperaturama između 12 i 37 °C (Piontek i sur., 2016).

Jakšić i sur. 2020. su kao dominantne proizvođače 5-MET prepoznali *A. jensenii* i *A. creber* (podvrste *A. versicolor*). Uz njih 5-MET su proizvodili i *A. puulaauensis*, *A. tenneseensis* i *A. venenatus*. 5-MET u zatvorenim prostorima može biti deponiran u prašini u sklopu živih i mrtvih spora, te micelijskih fragmenata (Dabelić i sur., 2021).

1.5. Pojavnost 5-metoksisterigmatocistina

Kao sekundarni metabolit plijesni *A. versicolor* 5-MET je detektiran u građevinskim materijalima - tapetama i staklenoj vuni. *A. versicolor* se na tim materijalima pojavio ili kao mrlja zelene boje (zbog jake sporulacije) ili kao crvenkasto obojenje s malim brojem konidija (Nielsen i sur., 1999).

5-MET je detektiran i kao proizvod *A. versicolor* prisutnih u zraku i u kućnoj prašini. Mikotoksini, uključujući 5-MET, u većoj su mjeri pronađeni tijekom zime i u kućama oštećenima nakon poplave. Češća pojava zimi, i općenito, može se objasniti razlikama u grijanju i ventilaciji (Jakšić i sur., 2021).

Micheluz i sur. 2016. su pronašli 5-MET (uz STC) u prašini u knjižnici. Njegova prisutnost tamo pripisana je vrstama *A. jensenii* i *A. creber*. Pronađen je i u prašini zatvorenih životnih prostora (Šegvić Klarić i sur., 2018.).

Gravesen i sur. 1999. su u Danskoj istraživali materijale na kojima su rasle plijesni, sakupljene iz 23 različite zgrade. Uzroci infestacije plijesnima u tim zgradama bili su curenje vode kroz krovove, povišena vlaga, i neispravne vodoinstalacije. Općenito, materijali najskloniji infestaciji plijesnima bili su stari organski materijali koji sadrže celulozu, poput drvenih materijala, jute, tapeta i kartona.

U tom radu 5-metoksisterigmatocistin je pronađen i u gipsanim pločama koje su prethodno inokulirane s plijesnima *A. versicolor*, kako bi se utvrdilo koji supstrati pogoduju razvoju specifičnih mikotoksina.

Kad su u okolišu prisutne plijesni koje proizvode i 5-MET i STC, prema nekim podacima aspergili proizvode čak osam puta više 5-MET. Ti podaci upućuju da u uvjetima visokog aktiviteta vode, vrste roda *Aspergillus* preferencijalno proizvode 5-MET (Šegvić Klarić i sur., 2018). To zapažanje podudara se s podacima dobivenim u istraživanjima materijala umjetno inokuliranih mikotoksinima.

S obzirom na to da je 5-MET u ranije navedenim radovima uvijek detektiran uz STC, i budući da ih proizvode iste plijesni, prostori i proizvodi u kojima je pronađen STC potencijalno uz STC sadrže i 5-MET. Takvi prostori su, primjerice, radni prostori koji obiluju organskom prašinom, poput mlinova ili skladišta žitarica (Jakšić i sur., 2016).

Kako bi se našli novi potencijalno medicinski korisni spojevi, istraživači sve češće pretražuju i uzorkuju slabo istražene prostore, poput dubina oceana ili polarnih dijelova zemlje. U pretraživanju dubokomorskih organizama, dobiven je ekstrakt iz gljivice identificirane kao *A. versicolor* (na 800 m dubine). Kemijska analiza ekstrakta identificirala je četiri produkta iz *A. versicolor*, jedan od kojih je bio 5-MET. U tom je radu uz to pokazano da je 5-MET umjereno citotoksičan prema staničnim linijama A549 i HL-60 (stanice leukemije) (Cai i sur., 2011). 5-MET je u sličnom radu izoliran iz gljivice iz šume mangrova u Južnokineskom moru (Shao i sur., 2007).

1.6. Analitičke metode za detekciju

S obzirom na to da je 5-MET generalno slabo istražen, prisutan je nedostatak informacija i o analitičkim metodama za njegovu detekciju, posebice u prehrambenim proizvodima. Međutim, imajući na umu veliku strukturnu sličnost sa STC-om, može se očekivati da su saznanja o prikladnosti analitičkih postupaka za ekstrakciju i detekciju STC-a barem do neke mjere primjenjiva i na 5-MET.

U ranije navedenim radovima u kojima je 5-MET detektiran, metode korištene za njegovu detekciju bile su tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke

djelotvornosti (HPLC), tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (LC-MS) i masena spektrometrija (MS).

Metode za dokazivanje mikotoksina općenito mogu se podijeliti u kvantitativne i kvalitativne, orijentacijske (engl. *screening*) i potvrdne (engl. *confirmatory*), te u imunokemijske i kromatografske (Pleadin i sur., 2019.).

Imunokemijska metoda koju je moguće primijeniti u detekciji STC-a je enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA). To je brza, jednostavna i ekonomski isplativa metoda, no nedostatak joj je križna reaktivnost s aflatoksinima – umjesto STC-a može detektirati strukturno srodne spojeve. Zato je prikladna kao orijentacijska metoda, a za pouzdanije rezultate potrebno je koristiti druge metode (Lešić i sur., 2019).

Kromatografske metode prikladne za detekciju i određivanje STC-a su tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), te tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (LC-MS). Najčešće se koristi TLC uz fluorescentnu detekciju. TLC je jednostavna, brza i jeftina metoda koja, međutim, ima nisku osjetljivost (visoki LOD) i nisku selektivnost, pa je prikladna kao orijentacijska metoda. U izvedbi TLC-a nužan je postupak derivatizacije kako bi se pojačala fluorescencija STC-a i olakšala njegova vizualizacija. Za to se koristi etanolna otopina aluminijske klorida, kojim se TLC ploča prska nakon razvijanja i prije zagrijavanja na temperaturi od 180°C (Pleadin i sur., 2019; EFSA, 2013).

Za STC se kao potvrdne metode koriste sofisticiranije kromatografske metode poput HPLC-a i LC-MS-a. Zajednički nedostaci ovih metoda su skupa oprema i kompleksnost analitičkog procesa, no one omogućuju kvantitativno određivanje, znatno niži limit detekcije i veću selektivnost (Lešić i sur., 2019).

1.7. Pivo i mikotoksini

Loše prozračeni vlažni i prašnjavi zatvoreni prostori pogoduju rastu plijesni producenata 5-MET-a. Što se tiče proizvodnje piva, skladišta i proizvodni pogoni mogu biti takvi prostori.

Pivo je najstarije i najviše konzumirano alkoholno piće na svijetu. Najviše ga se popije u Europi, a Hrvatska se s sa 72 popijene litre po glavi stanovnika nalazi među 20 država s najvećom potrošnjom ovog alkoholnog pića (slika 2).

Glavni sastojci u proizvodnji piva su voda, ječam, hmelj i kvasac. Kvaliteta ječma smatra se presudnom za kvalitetu krajnjeg proizvoda. Kontaminacija piva mikotoksinima može potjecati od prehrambenih sirovina od kojih se proizvodi - ječma, ječmenog slada, hmelja ili drugih dodanih sastojaka (Pascari i sur., 2018).

Ovisno o načinu fermentacije postoje dva glavna tipa piva: pivo gornjeg vrenja (*ale*) i pivo donjeg vrenja (*lager*). Među ostalim, ključne razlike su u vrsti kvasca korištenoj za fermentaciju (*Saccharomyces cerevisiae* za lager, *Saccharomyces pastorianus* za ale), temperaturi fermentacije (18-25 °C za ale, 7-15 °C za lager), fermentiranim šećerima i sekundarnim produktima fermentacije (Kunze, 2006).

Proces proizvodnje piva obuhvaća tri glavne biokemijske reakcije: aktivaciju enzima u zrnima ječma tijekom germinacije, degradaciju škroba u fermentabilne šećere provedenu tim enzimima, i alkoholnu fermentaciju koju provode kvasci *Saccharomyces*, proizvodeći CO₂ i etanol (Kunze, 2006).

Kontaminacija mikotoksinima općenito može se dogoditi u različitim fazama proizvodnje. Neki od njih mogu biti preneseni s žitarice u sladovinu pa onda i u pivo jer imaju visoku termalnu stabilnost. Takvi su aflatoksini, zearalenon i deoksinivalenol (Rodríguez-Carrasco i sur., 2015).

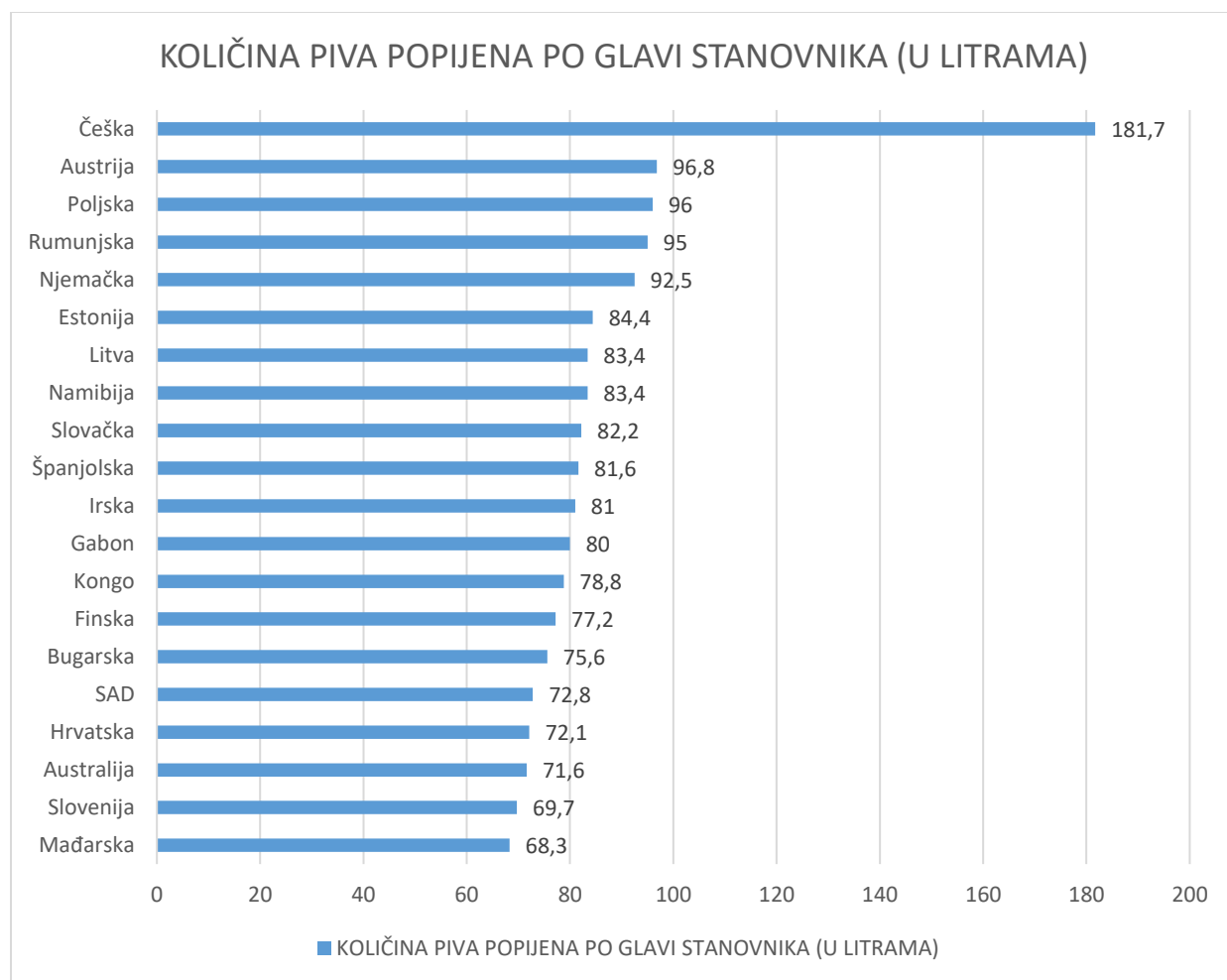
Mikotoksini su izrazito stabilni spojevi, otporni na visoke temperature i ekstremne vrijednosti pH (Wolf i Bullerman, 1998). Iako se tijekom proizvodnje piva ne postižu temperature potrebne za uništavanje mikotoksina, i niže temperature mogu utjecati na krajnju koncentraciju mikotoksina, zbog fizičkih, kemijskih i biokemijskih promjena koje se događaju (Pascari i sur., 2018).

Biomasa gljivica raste tijekom germinacije ječma, kao rezultat kontaminacije iz vode ili latentne infekcije u zrnima ječma, koja može postati aktivna uslijed povećanja vlage (Vegi et al., 2011). Niessen i sur. su 1993. utvrdili da pšenično pivo sadrži više razine deoksinivalenola od piva čiji je sastojak ječam. Ta je razlika pripisana razlikama u matriksu pšenice i ječma, koje uvjetuju mikobiotu žitarica.

Kontaminacija STC-om u pivu se događa u površinskim slojevima piva, a sirovine se kvare tijekom zrenja i skladištenja (Kobayashi i sur., 2018; Lu i sur., 2018). Glavni uzrok kontaminacije vjerojatno su uvjeti skladištenja, s obzirom na to da *A. versicolor* u uvjetima visoke vlažnosti zraka

i na temperaturama iznad 26°C proizvodi velike količine STC-a, 5-MET-u strukturno vrlo sličnog spoja (Lu i sur., 2018).

Smatra se da anorganski adsorbensi korišteni za bistrenje piva mogu igrati ulogu u odstranjivanju mikotoksina iz piva. Adsorpcija na površinu ovisi o polarnosti mikotoksina, njegovoj topljivosti u vodi, veličini molekule itd. Primjerice, silikagel modificiran -Cl i -CN skupinama bio je vrlo učinkovit u vezanju okratoksina i fumonizina i nije mijenjao organoleptička svojstva piva (Belajova, Rauova, Daško, 2007).



Slika 2. Podaci o potrošnji piva u svijetu 2020. godine (podaci preuzeti s <http://worldpopulationreview.com>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pivo je najčešće konzumirano alkoholno piće na svijetu. Najviše ga se popije u Europi, a Hrvatska se sa 72 popijene litre po glavi stanovnika nalazi među 20 država s najvećom potrošnjom ovog alkoholnog pića.

Sirovine potrebne za proizvodnju piva, posebice žitarice, pogodan su supstrat za rast plijesni proizvođača STC i 5-MET, primjerice aspergila iz serije *Versicolores*. Također, za njihov su rast pogodni i prostori u kojima se te sirovine skladište i proizvode. Naime, uz prikladni supstrat proizvodni pogoni i skladišta mogu pružati i adekvatne uvjete vlažnosti zraka, temperature i pH.

U takvim uvjetima pokazano je i da je vrsta *A. jensenii* jedna od najčešće detektiranih plijesni i da može proizvoditi citotoksične i genotoksične mikotoksine STC i 5-MET.

S obzirom na rizik da *A. jensenii* u skladišnim prostorima proizvodi 5-MET i STC koji dopijevaju u gotove prehrambene proizvode te budući da se radi o toksičnim tvarima, moguća prisutnost 5-MET u pivu predstavljala bi potencijalnu opasnost za konzumente, kojih kako je ranije navedeno ima mnogo.

Podataka o prisutnosti 5-MET u prehrambenim proizvodima nema. U pretraživanju literature nije nađen nijedan rad koji ispituje prisutnost 5-MET u nekoj prehrambenoj sirovini ili proizvodu, bilo s pozitivnim bilo s negativnim rezultatima. Međutim, STC, strukturno sličan toksin, nađen je u nizu prehrambenih proizvoda. Njegovu prisutnost u pivu ispitivao je samo mali broj radova, no nijedan od njih nije proveden u Republici Hrvatskoj.

Sa svime ovime na umu ciljevi ovog rada su:

- optimizirati metodu ekstrakcije piva i ispitati njezinu primjenjivost za dokazivanje mikotoksina 5-MET u pivu
- analizirati uzorke piva različitih vrsta i različitih proizvođača, prikupljenih u RH, s ciljem utvrđivanja prisutnosti mikotoksina 5-MET
- procijeniti zdravstvene rizike koji mogu proizaći iz konzumacije 5-MET-om kontaminiranih proizvoda

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 5-metoksisterigmatocistin, 5-MET (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- acetonitril p.a. (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena kiselina (Kemig, Zagreb, Hrvatska); radna otopina sastava 1% v/v u vodi
- magnezijev sulfat (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev klorid (Kemig, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Radni instrumenti

- analitička vaga (Kern ABJ, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Njemačka)
- ultrazvučna vodena kupelj
- termomikser (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga (Tabletop Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- kolone Bond Elut Mycotoxin (Bond Elut Mycotoxin, Agilent, Santa Clara, USA)
- termovakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)
- UV-komora (UVP EPI CHEMI darkroom, Cambridge Manufacturing Co Ltd., Brakey Road Corby, UK)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ekstrakata

Za provedbu analize skupljeno je 100 uzoraka piva, raznolikih vrsta i različitih sadržaja alkohola, iz raznolikih ambalažama, podrijetlom iz različitih država. Od svakog piva uzet je uzorak od 50 mL. Do početka analize uzorci su čuvani na temperaturi od -20 °C.

Ekstrakcija 5-MET-a provedena je modifikacijom načina opisanog u Stroka i sur., 2004. te slijedeći upute proizvođača SPE¹ kolone (Bond Elut Mycotoxin, Agilent, Santa Clara, USA). Na dan analize uzorci su odmrznuti na sobnoj temperaturi, te su od njih uzeti alikvoti od 5 mL.

Nakon degasiranja u alikvote je dodano 5 mL acetonitrila (p.a.) i 5 mL ledene octene kiseline (1% v/v). Zatim je uslijedila inkubacija u termomikseru (40 °C, 1000 rpm, 10 min). Potom je bilo potrebno odvojiti organsku i vodenu fazu. Za to je korištena smjesa soli sastava MgSO₄ (2,0 ± 0,1 g) i NaCl (0,50 ± 0,1 g). Idući korak bila je ponovna inkubacija u termomikseru pod istim uvjetima.

Za učinkovito razdvajanje uzorci su centrifugirani na 3350 g tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon toga, 2 mL supernatanta propušteno je kroz SPE kolonu sa silikatnim ionskim izmjenjivačem, brzinom 1-2 kapi po sekundi. Te su kapi skupljene u polipropilensku mikroeprijetu.

Eluati su onda stavljeni u vakuum-uparivač, gdje su upareni do suha, na temperaturi od 60 °C. Dobro zatvoreni suhi ekstrakti čuvani su u zamrzivaču do analize, ne više od tjedan dana.

3.2.2. Ispitivanje prisutnosti 5-MET u ekstraktima piva metodom tankoslojne kromatografije

Na dan analize ekstrakti su se temperirali na sobnoj temperaturi pa su se otopili u 150 µL metanola (p.a.). Zatim su se inkubirali u termomikseru 15 min, na 40 °C i na 1000 rpm. Potom su metanolni ekstrakti centrifugirani (3350 g, 10 min) kako bi se istaložile nečistoće. Bistri supernatant nanesen je na TLC ploče silikagel 60, bez indikatora.

Smjesa otapala toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90% v/v) u omjeru 5:4:1 (v/v) korištena je kao mobilna faza (Samson i sur., 2011). Kao standard je korištena otopina 5-MET u acetonitrilu, na početku koncentracije 0,005 M, a potom koncentracije 0,004 M. Uzorci su nanesen na ploče u volumenu od 20 µL a standard u volumenima od 1 µL i 2 µL, ovisno o ploči (1,4 µg, odnosno 2,8 µg po mrlji)

Ploče su se razvijale u zatvorenoj komori u smjesi otapala 40 minuta, pa su osušene fenom i ujednačeno poprskane 80%-tnom otopinom aluminijska klorida u 60%-tnom etanolu (kako bi se

¹ SPE = solid phase extraction. SPE kolone odvajaju analit iz otopine na način da se otopina propušta kroz čvrstu stacionarnu fazu.

pojačala fluorescencija). Potom su ploče grijane na temperaturi od 130 °C 8 minuta, i odmah nakon toga promatrane u UV komori pod svjetlom valne duljine 365 nm.

3.3. Statistička analiza

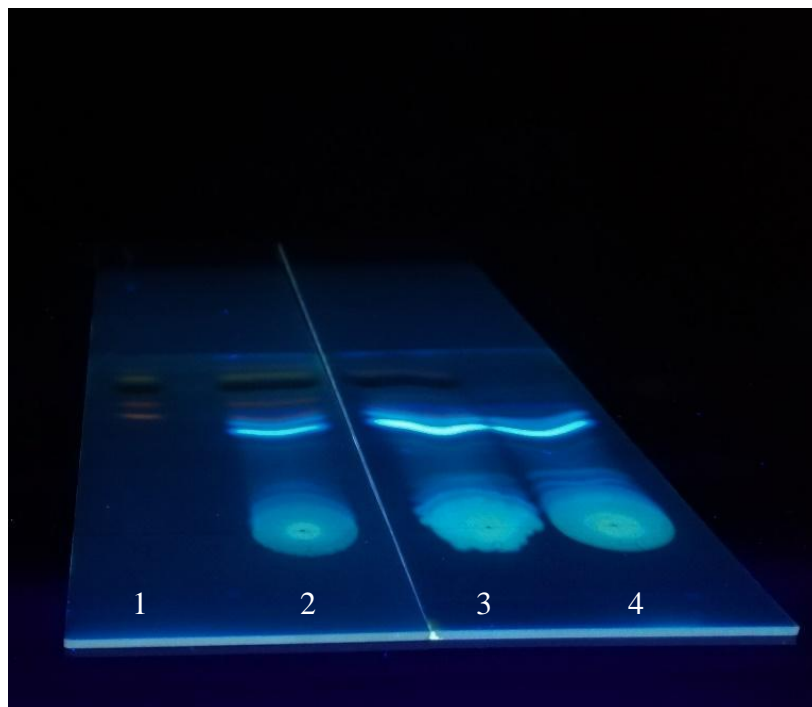
Cilj statističke analize bio je utvrditi utječe li neko obilježje piva u statistički značajnoj mjeri na pojavnost 5-MET u pivu. Proučavano je šest različitih obilježja piva. Sadržaj alkohola predstavljao je kontinuiranu varijablu, a ostalih pet analiziranih obilježja (je li pivo svijetlo ili tamno, tip piva, provedba pasterizacije, pšenica u sadržaju, ambalaža) predstavljalo je kategorijske varijable. Zato je za procjenu povezanosti sadržaja alkohola i pojavnosti toksina korišten nezavisni t-test, a za ostala obilježja Fisherov test ili hi-kvadrat test. Fisherov test korišten je kad je neka kategorijska varijabla mogla poprimiti samo dva stanja (npr. je li pivo svijetlo ili tamno), a hi-kvadrat test kad je mogla poprimiti tri ili više stanja (npr. je li pivo lager, ale, pilsner ili stout). Za izvedbu tih metoda korišten je softver GraphPad Prism 9. Obradom podataka dobivena je p-vrijednost (jedna p-vrijednost za svako obilježje). Prag statističke značajnosti prijeđen je ako je p-vrijednost bila manja od 0,05.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvo je bilo potrebno utvrditi je li primijenjeni postupak ekstrakcije i analize adekvatan za detekciju 5-MET. Također, trebalo je provjeriti utječu li komponente matriksa (ostali sastojci piva) na položaj mrlje koja odgovara 5-MET-u.

Kako bi se to utvrdilo, uzorci su obogaćeni matičnom otopinom 5-MET u acetonitrilu (0,005 M). Bilo je potrebno dodati 5-MET u neki uzorak i na početku ekstrakcije i na kraju ekstrakcije. Na slici 3 prikazani su dobiveni kromatogrami. Mrlja karakteristična za 5-MET vidljiva je i u uzorku koji je obogaćen nakon degasiranja (nakon prvog koraka ekstrakcije), i u uzorku koji je obogaćen netom prije nanošenja na TLC (nakon zadnjeg koraka ekstrakcije). Također, ne postoji vidljiva razlika u intenzitetima tih dviju mrlja. Dakle, 5-MET se, ako je u uzorku prisutan u dovoljnoj koncentraciji, neće izgubiti tijekom ekstrakcije. Nadalje, komponente matriksa piva ne utječu na poziciju mrlje na TLC ploči. Također, količina 5-MET kojom je uzorak obogaćen dovoljna je da bude vidljiva na ploči.

Ispitujući s koliko najmanje 5-MET je moguće obogatiti otopinu uzorka a da mrlja karakteristična za 5-MET i dalje bude vidljiva na ploči, dobiven je limit detekcije 5-MET-a koji iznosi 3,2 µg/mL. S obzirom na to da je 5-MET slabo istražen, nema usporedivih podataka o limitu detekcije za 5-MET u sličnim istraživanjima. Za STC, usporedive TLC tehnike imaju zabilježene LOD vrijednosti koje variraju u rasponu od 2 do 140 µg/kg. (EFSA, 2013).



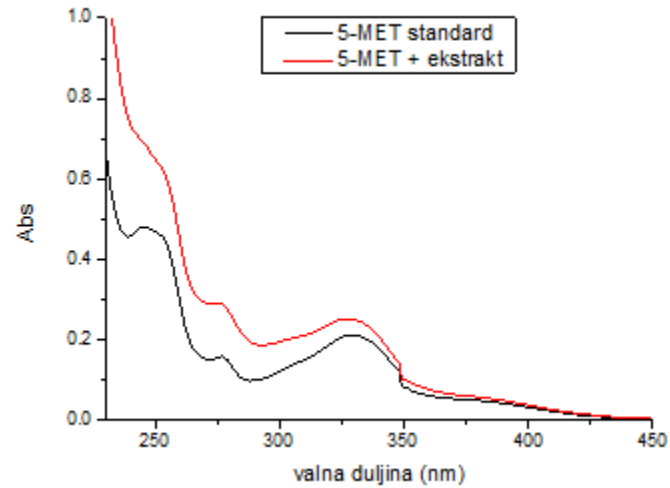
Slika 3. TLC ploče silikagel 60 (bez indikatora) razvijane u mobilnoj fazi toluen/etil-acetat/mravljia kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, gledane u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 265 nm. Narančasta i crna linija odgovaraju 5-MET-u

Uzorci i standardi nanoseni na startnu liniju označeni su brojevima od 1 do 4:

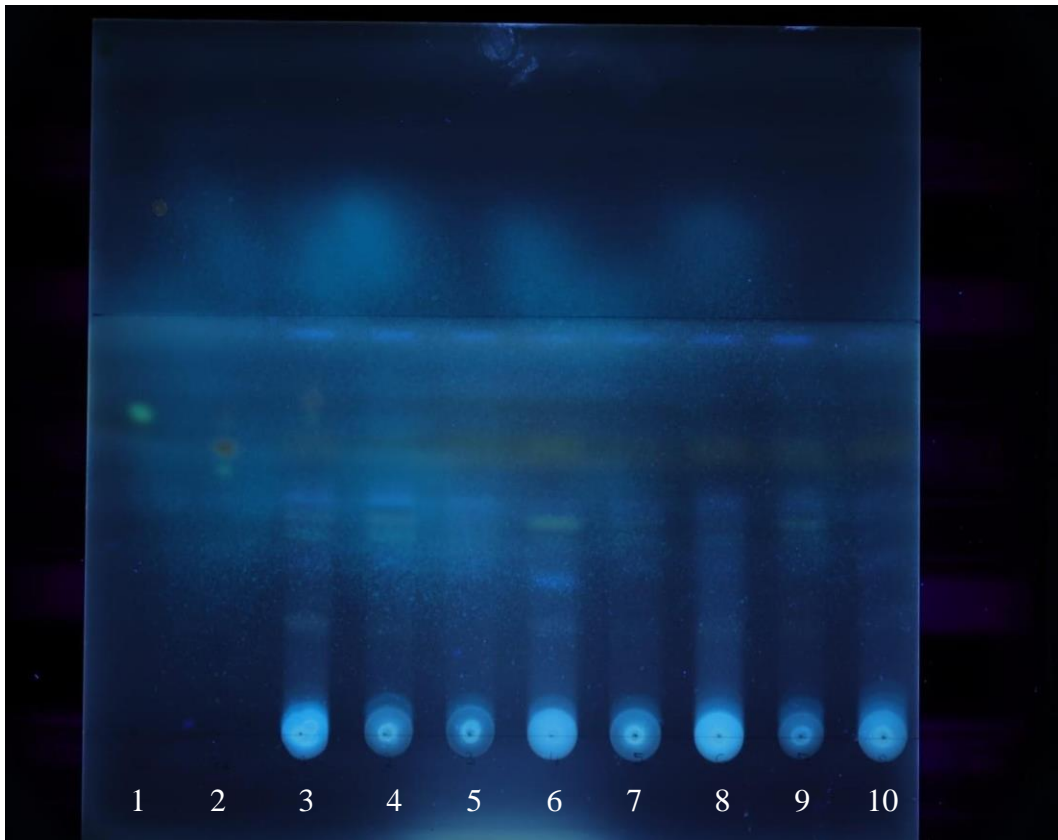
1. standard 5-MET 0,005 M (8,85 μg 5-MET u 5 μL)
2. uzorak obogaćen matičnom otopinom 5-MET neposredno prije nanošenja na TLC ploču (17,70 μg u 40 μL)
3. uzorak obogaćen matičnom otopinom 5-MET odmah nakon degasiranja (18,89 μg u 40 μL)
4. uzorak bez dodanog 5-MET

Opisanom metodom analizirano je ukupno 58 uzoraka piva. 27 uzorak od 58 (46,55%) bio je pozitivan na 5-MET. Odnosno, za 27 uzoraka je na TLC ploči uočena smeđenarančasta fluorescentna mrlja na duljini od starta jednakoj duljini od starta na kojoj se nalazi smeđenarančasta mrlja uzorka standardne otopine 5-MET (slike 5-12). Kako bi se potvrdilo da je u pitanju uistinu 5-MET, napravljen je ekstrakt jedne strugotine sa silikagela, i analiziran UV/Vis

spektrofotometrijom. U toj analizi uočeno je povećanje apsorbancije 5-MET nakon dodatka ekstrakta standardu 5-MET (slika 4).

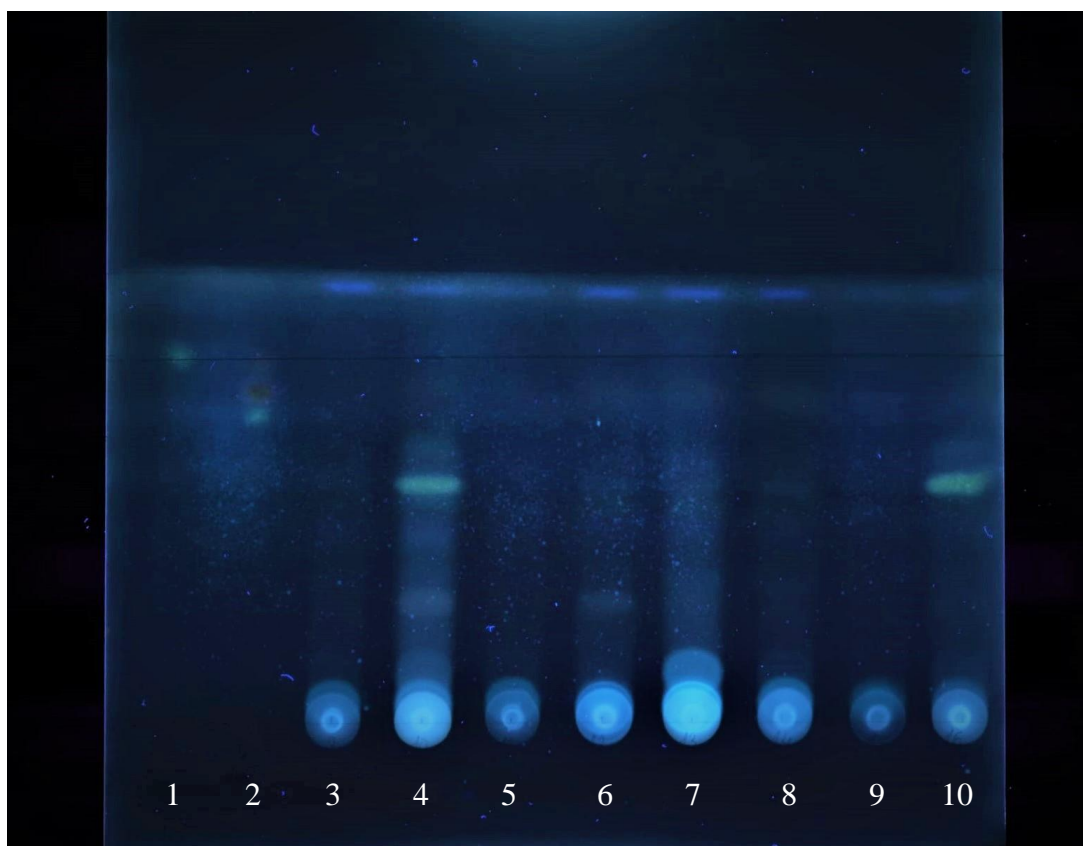


Slika 4. Usporedba apsorpcijskih spektara 5-MET iz ekstrakta strugotine s TLC ploče i 5-MET iz standardne otopine



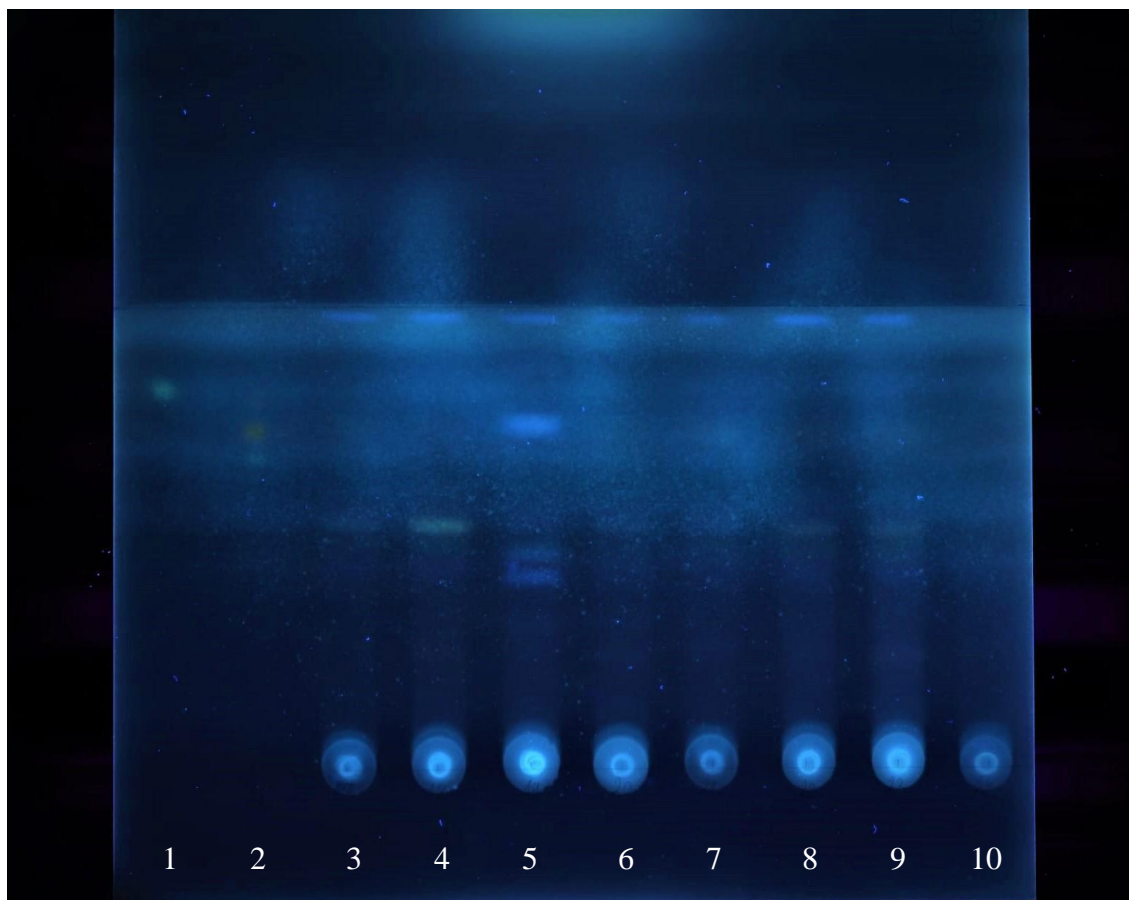
Slika 5. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 1 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard STC u acetonitrilu (0,97 μg STC u 1 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (1,4 μg 5-MET u 1 μL)
3. uzorak 1
4. uzorak 3
5. uzorak 8
6. uzorak 11
7. uzorak 12
8. uzorak 14
9. uzorak 15
10. uzorak 16



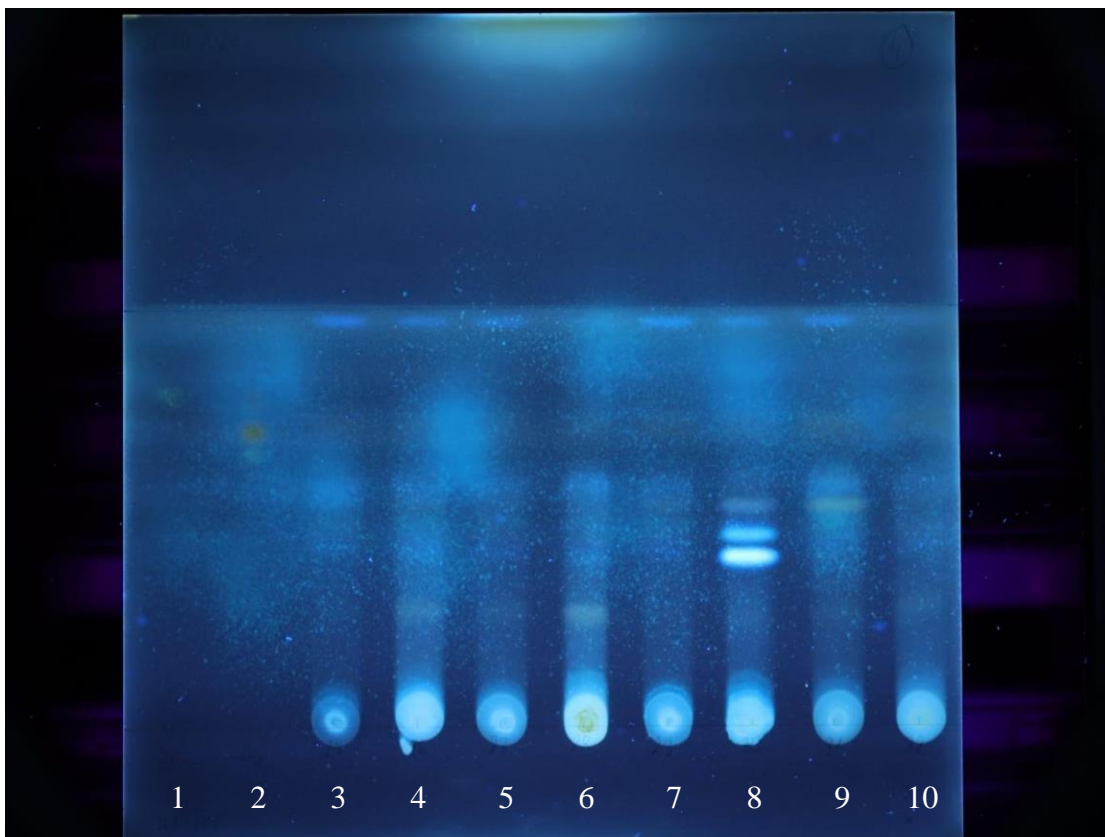
Slika 6. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom $AlCl_3$ u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 2 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard STC u acetonitrilu (1,94 μg STC u 2 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (2,8 μg 5-MET u 2 μL)
3. uzorak 18
4. uzorak 20
5. uzorak 22
6. uzorak 34
7. uzorak 35
8. uzorak 36
9. uzorak 37
10. uzorak 38



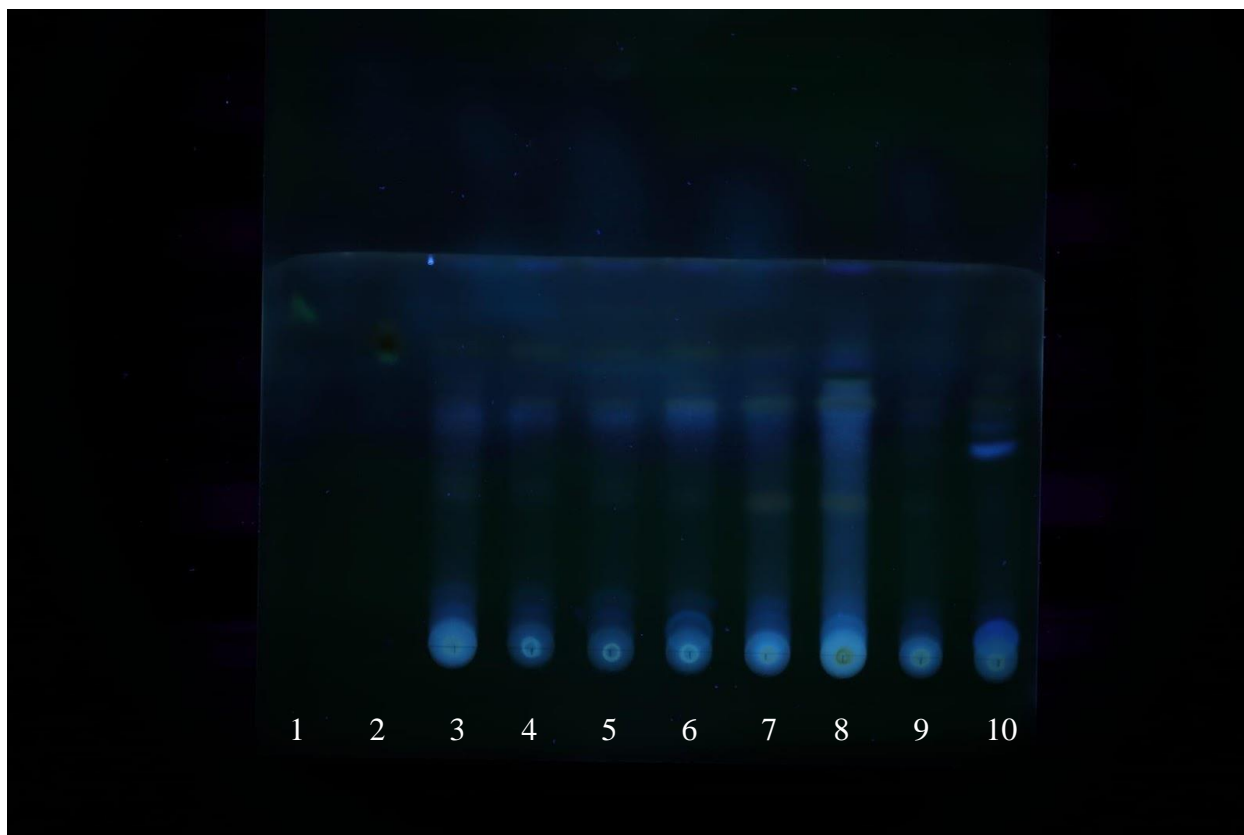
Slika 7. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 1 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard STC u acetonitrilu (0,97 μg STC u 1 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (1,4 μg 5-MET u 1 μL)
3. uzorak 39
4. uzorak 40
5. uzorak 41
6. uzorak 42
7. uzorak 43
8. uzorak 44
9. uzorak 45
10. uzorak 46



Slika 8. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 1 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard 5-MET u acetonitrilu (0,97 μg 5-MET u 1 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (1,4 μg 5-MET u 1 μL)
3. uzorak 47
4. uzorak 48
5. uzorak 49
6. uzorak 50
7. uzorak 51
8. uzorak 52
9. uzorak 53
10. uzorak 54



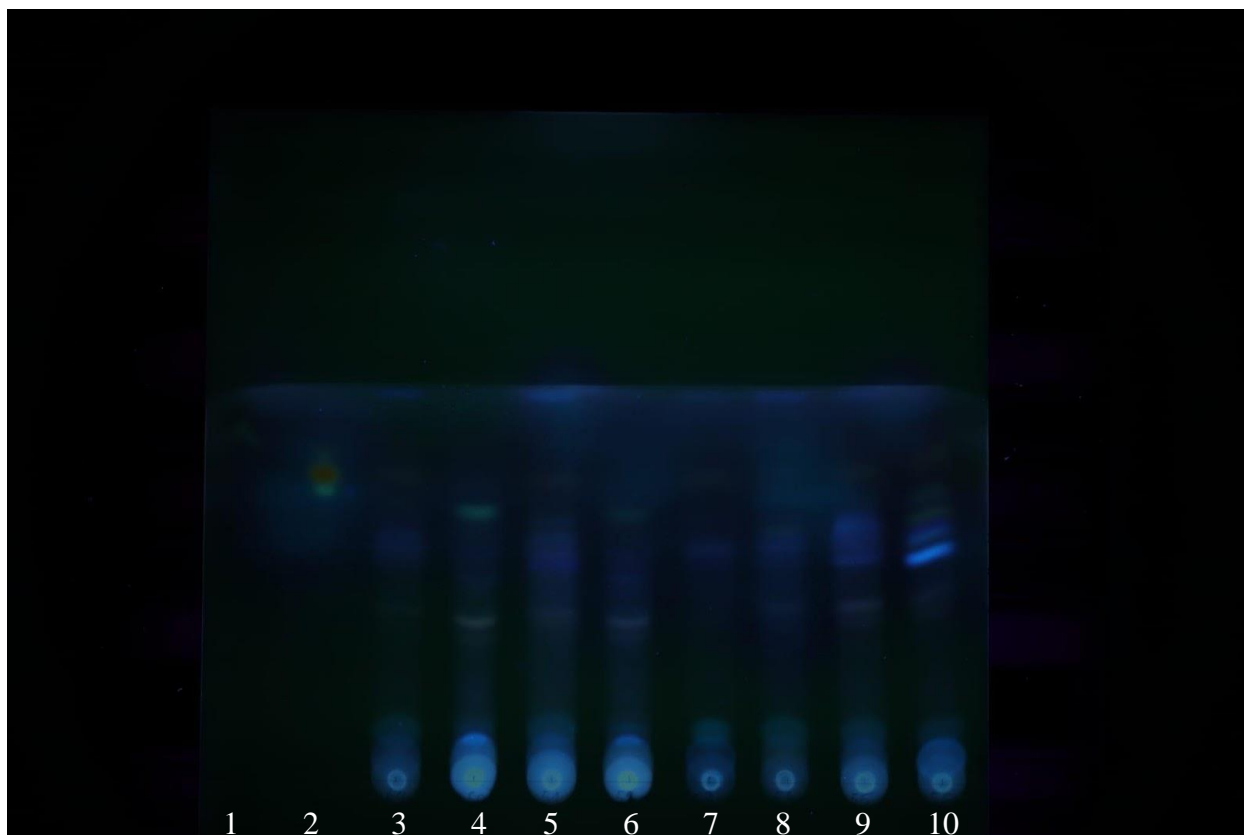
Slika 9. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-
acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-
tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog
od uzoraka i po 2 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard STC u acetonitrilu (1,94 μg STC u 2 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (2,8 μg 5-MET u 2 μL)
3. uzorak 55
4. uzorak 57
5. uzorak 59
6. uzorak 61
7. uzorak 63
8. uzorak 64
9. uzorak 66
10. uzorak 68



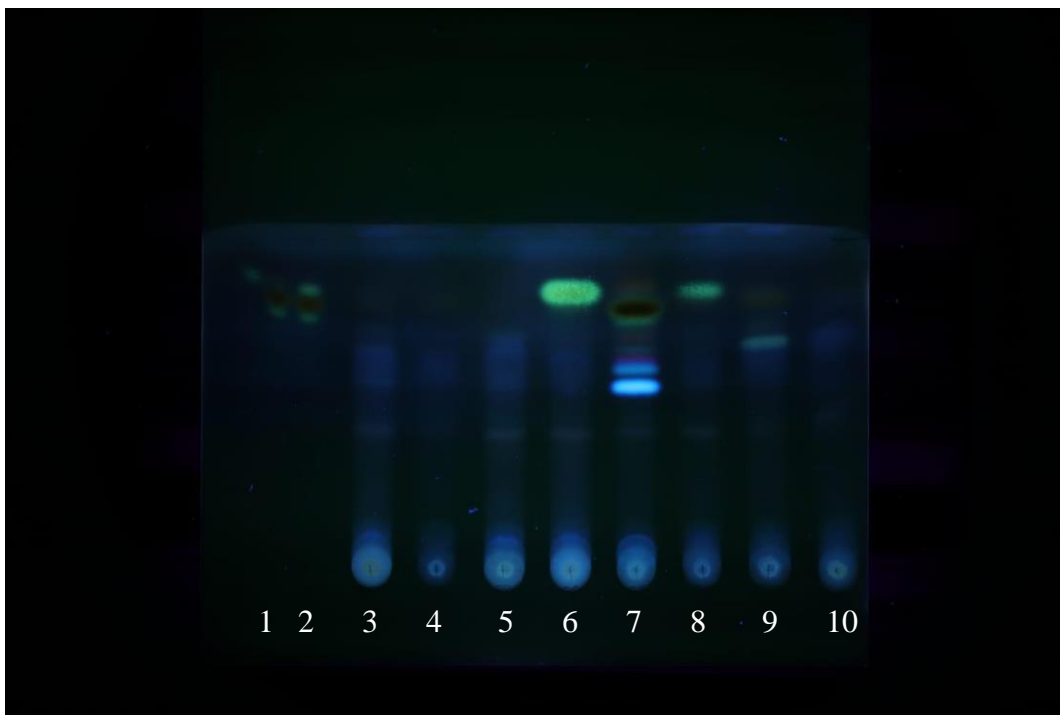
Slika 10. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 2 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard STC u acetonitrilu (1,94 μg STC u 2 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (2,8 μg 5-MET u 2 μL)
3. uzorak 69
4. uzorak 70
5. uzorak 71
6. uzorak 73
7. uzorak 75
8. uzorak 76
9. uzorak 79
10. uzorak 35 (na prijašnjoj ploči pozitivan, korišten za kontrolu)



Slika 11. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 2 μL svakog od standarda naneseo je na startnu liniju TLC ploče, pri čemu je:

1. standard 5-MET u acetonitrilu (1,94 μg 5-MET u 2 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (2,8 μg 5-MET u 2 μL)
3. uzorak 62
4. uzorak 77
5. uzorak 80
6. uzorak 83
7. uzorak 84
8. uzorak 85
9. uzorak 86
10. uzorak 68



Slika 12. TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90%) u omjeru 5:4:1 v/v/v, prskana 80%-tnom otopinom AlCl_3 u 60%-tnom etanolu, gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Po 20 μL svakog od uzoraka i po 2 μL svakog od standarda nanoseno je na startnu liniju TLC ploče. Na ploči se nalazi još nekoliko uzoraka, obogaćenih toksinima, međutim njihova prisutnost ovdje nije u fokusu, korišteni su za da se provjeri jesu li standardi i dalje adekvatni za provođenje metode nakon što se u više navrata njima rukovalo. Na ploči su:

1. standard STC u acetonitrilu (1,94 μg STC u 2 μL)
2. standard 5-MET u acetonitrilu (2,8 μg 5-MET u 2 μL)
3. uzorak 91
4. uzorak 92
5. uzorak 93
6. uzorak 14, obogaćen STC-om nakon degasiranja
7. uzorak 53, obogaćen 5-MET-om nakon degasiranja
8. uzorak 48, obogaćen STC-om netom prije nanošenja na TLC ploču
9. uzorak 58, obogaćen 5-MET-om netom prije nanošenja na TLC ploču
10. uzorak 89

Prikupljeni uzorci piva po više su parametara podijeljeni u nekoliko podskupina, s ciljem utvrđivanja utječe li neki od tih parametara na pojavnost mikotoksina. Obilježja uzoraka u pitanju su vrsta piva (je li pivo svijetlo ili tamno te je li pivo lager, ale, pilsner ili stout), sadržaj alkohola, je li provedena pasterizacija, je li jedan od sastojaka u pivu pšenica, i ambalaža/podrijetlo piva (staklena boca, limenka ili točionik u kafiću).

Među 58 uzoraka 44 uzoraka bilo je svijetlo pivo, 13 ih je bilo tamno pivo, a 1 je bilo mješavina svijetlog i tamnog. 45,45% svijetlih (20 od 44) uzoraka je bilo pozitivno na 5-MET, kao i 53,85% tamnih (7/13). Ovisno o informacijama na ambalaži, pivo je podijeljeno i u podvrste - lager, pilsner, ale i stout. Bilo je i nekoliko uzoraka za koje na ambalaži nije deklarirana specifična vrsta, ili koji spadaju u neku drugu kategoriju. Analiza je provedena samo za one vrste piva kojima su pripadala minimalno 2 uzorka (a to su lager, pilsner, ale i stout). 42,31% (11 od 26) lagera, 60,00% (12 od 20) aleova, 20,00% (1 od 5) pilsnera, i 66,67% (2 od 3) stoutova bilo je pozitivno na 5-MET.

Što se tiče sadržaja alkohola, pozitivni uzorci u prosjeku su sadržavali 4,87% alkohola, a negativni uzorci 4,85%. Što se tiče pasterizacije, za 22 piva je na ambalaži eksplicitno pisalo da su pasterizirana, a za 7 piva je eksplicitno pisalo da nisu. Ostala piva na ambalaži nisu imala informaciju o pasterizaciji. 45,45% (10 od 22) pasteriziranih uzoraka i 71,43% (5 od 7) nepasteriziranih uzoraka bilo je pozitivno na 5-MET.

Pšeničnih piva ili piva koja sadrže pšenicu bilo je ukupno 7. 71,43% (5 od 7) bilo je pozitivno na 5-MET. Taj postotak za ostala piva (koja ne sadrže pšenicu) bio je 43,14% (22 od 51). 50,00% uzoraka piva iz staklene boce (16 od 32) i iz točionika (1 od 2) bilo je pozitivno na 5-MET, a za piva iz limenki taj postotak bio je 41,67% (10 od 24). Podaci iz zadnja tri odlomka sumirani su u tablicama 1-6.

Statistički, provedbom nezavisnog t-testa, hi-kvadrat testova i Fisherovog testa (ovisno o vrsti varijable) nije zabilježena statistički značajna povezanost nijednog obilježja piva s pojavnosti 5-MET u njemu. Najbliže pragu statističke značajnosti bila je p-vrijednost u ispitivanju toga je li pšenica kao sastojak prediktor pojave 5-MET. (U toj je analizi p-vrijednost iznosila 0,2332). Ograničavajući faktor za utvrđivanje statistički značajne povezanosti parametara i pojavnosti toksina bio je broj uzoraka. Također, među skupljenim uzorcima ima, primjerice, puno više svijetlih nego tamnih piva, ili puno manje pšeničnih piva nego piva koja nisu pšenična. Ovakve bi

metode imala veću statističku moć da je broj piva koja se razlikuju po nekom obilježju sličniji (npr. da ima otprilike podjednako svijetlih i tamnih piva).

Tablica 1. Ovisnost kontaminacije 5-MET-om o vrsti piva (svijetlo, tamno).

VRSTA PIVA (tamno/svijetlo)	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
svijetlo	44	20	45,45%
tamno	13	7	53,85%

Tablica 2. Ovisnost kontaminacije 5-MET-om o vrsti piva (lager, ale, pilsner, stout).

VRSTA PIVA (lager/ale/pilsner/stout)	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
lager	26	11	42,31%
ale	20	12	60,00%
pilsner	5	1	20,00%
stout	3	2	66,67%

Tablica 3. Ovisnost prosječnog sadržaja alkohola o kontaminiranosti 5-MET-om.

	prosječni sadržaj alkohola
uzorci pozitivni na 5-MET	4,87%
uzorci negativni na 5-MET	4,85%

Tablica 4. Ovisnost kontaminacije 5-MET-om o pasterizaciji.

PASTERIZACIJA	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
pasterizirano pivo	22	10	45,45%
nepasterizirano pivo	7	5	71,43%

Tablica 5. Ovisnost kontaminacije 5-MET-om o prisutnosti pšenice među sastojcima piva.

PŠENICA KAO SASTOJAK	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
da	7	5	71,43%
ne	51	22	43,14%

Tablica 6. Ovisnost kontaminacije 5-MET-om o ambalaži iz koje pivo potječe.

AMBALAŽA	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
staklena boca	32	16	50,00%
limenka	24	10	41,67%
točionik	2	1	50,00%

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi nalaz 5-MET u pivu, i prvi nalaz 5-MET u nekom prehrambenom proizvodu općenito. Međutim, pronalazak 5-MET u pivu nadovezuje se na podatke iz literature o prisutnosti STC u prehrambenim proizvodima uključujući pivo. STC je pronađen u žitaricama (pšenica, ječam, raž, zob, heljda, kukuruz, riža), kruhu, siru, orašastim plodovima (pekan, kikiriki), zrnima kave i začинима (komorač, papar, kim, mažuran) (Veršilovskis i de Saeger, 2010). Što se tiče piva, Veršilovskis i sur. 2008. su analizirali 26 uzoraka piva prikupljenih u Latviji i detektirali STC u 2 uzorka u koncentracijama 4-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Samim time što je ovo prvi nalaz 5-MET u nekom prehrambenom proizvodu, ovaj rad potvrđuje prikladnost izvedene analitičke metode za ekstrakciju i detekciju 5-MET. Također, limit detekcije utvrđen ovim radom (3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) predstavlja podatak koji može biti koristan kao referentna točka za moguće kasnije slične radove.

Također, ovaj rad učvršćuje poveznicu između prisutnosti *A. versicolores* u vlažnim prostorima, njihove proizvodnje mikotoksina i dospijeca mikotoksina u prehrambene proizvode. *A. versicolor* se ubraja među najčešće plijesni u zatvorenim prostorima (Piontek i sur., 2016). Također, *A. versicolor* je ubikvitarna plijesan. Osim u zraku u zatvorenim prostorima pronađena je, među

ostalim, na supstratima poput zemlje/tla, prašine, drveta, gumenih kablova, u zraku i na različitim vrstama hrane (Jakšić i sur., 2016). Radi se o kserofilnoj plijesni. Iako je optimalni aktivitet vode za njezin rast 0.95, minimalni aktivitet vode na kojem može rasti je 0.75. Može rasti u temperaturnom rasponu od 4 do 40 °C. Nije poznato i potrebno je razjasniti koji uvjeti pogoduju proizvodnji 5-MET specifično. Za proizvodnju STC-a optimalni su uvjeti temperatura između 23 i 29 °C, aktivitet vode viši od 0,76 te sadržaj vlage u zraku veći od 15% (Veršilovskis i de Saeger, 2010).

Postavlja se pitanje na koji je način 5-MET u pivo dospio. S obzirom na to da je inače u literaturi 5-MET dominantno detektiran kao produkt plijesni roda *Aspergillus* serije *Versicolores*, izgledna je opcija da su ove plijesni upletene u njihovu proizvodnju. Korisno bi bilo uzorkovati zrak, prašinu i sirovine u proizvodnim pogonima i skladištima pivovara, da se utvrdi učestalost prisutnosti *A. versicolores* i učestalost njihove proizvodnje 5-MET. Potrebno je razjasniti i kada se točno kontaminacija događa. Budući da je 5-MET najčešće pronađen u aerosolu ili deponiran u prašini, vjerojatno preko prašine dospijeva na žitarice. Međutim, korisno bi bilo ispitati sve sirovine i svu opremu u skladištenju i proizvodnom procesu. Također, treba isključiti mogućnost da su sirovine kontaminirane i prije nego što dospiju u skladište, bilo na polju, bilo tijekom žetve, bilo tijekom transporta.

Što se tiče analize pojavnosti 5-MET, najviši postotak pozitivnih uzoraka zabilježen je među aleovima i stoutovima, nepasteriziranim pivima, te pivima koja sadrže pšenicu. Međutim, glavno ograničenje donošenju zaključaka ili stvaranju osnovane sumnje da je nešto od navedenog prediktor pojave 5-MET je nedovoljan broj uzoraka. Za razjašnjavanje povezanosti različitih obilježja piva i pojave mikotoksina potreban je opsežniji rad koji uključuje znatno veći broj uzoraka.

Ograničenja ovog istraživanja također su uvjetovana ograničenjima upotrijebljene analitičke metode, specifično tankoslojne kromatografije. Moguće je da su zbog nedovoljne specifičnosti metode detektirani neki spojevi strukturno srodni 5-MET-u, a ne sam 5-MET. Također, moguće je da je zbog nedovoljne osjetljivosti metode 5-MET u nekim negativnim uzorcima prisutan, no u premalim količinama da bi nesumnjivo bio vidljiv na TLC ploči.

Zato je prikladan idući korak iste uzorke analizirati sofisticiranijom, selektivnijom i osjetljivijom metodom. HPLC spregnut s MS-om analitička je metoda koja bi mogla detektirati 5-MET ako je prisutan u nižoj koncentraciji i koja bi mogla isključiti mogućnost da se umjesto 5-MET-a detektiraju strukturno ili metabolički srodni spojevi. Također, ta bi metoda omogućila i kvantitativnu analizu.

Nadalje, veliko ograničenje u radu s 5-MET-om i u njegovoj detekciji je manjak informacija o metodama koje su prikladne za njegovu analizu i detekciju. Nedostaju podaci o prikladnosti različitih analitičkih tehnika za njegovu ekstrakciju i detekciju te podaci o limitima detekcije i kvantifikacije. Također, nema jasnih podataka o nekim ključnim svojstvima 5-MET-a, poput topljivosti i stabilnosti.

Nerazjašnjena je i sinteza 5-MET-a u plijesnima koje ga proizvode, te metabolički putovi u kojima sudjeluje. Nije jasna njegova metabolička relacija s STC-om ili s aflatoksinima. Također, nije utvrđen mehanizam njegove aktivacije i toksičnosti, koja je zapažena na nekim staničnim linijama.

Ovaj rad može predstavljati signal za potencijalnu javnozdravstvenu opasnost. Učestalost konzumacije piva, dokazana toksičnost ovog mikotoksina te sveprisutnost plijesni proizvođača u zatvorenim prostorima govore u prilog tome da rezultati ovog rada nisu zanemarivi te da su potrebna daljnja istraživanja. Međutim, potrebno je analizirati veći broj uzoraka sofisticiranijim metodama, te bolje utvrditi mehanizam i mjeru toksičnosti prije nego što se donose neki jasniji zaključci o opasnosti mikotoksina ili piva. Također, vrijedi istraživati i razmišljati u smjeru suzbijanja pojave mikotoksina piva, modifikacijom proizvodnih procesa.

Načini na koji se pojava mikotoksina (uključujući 5-MET) može izbjeći uključuju preventivne metode - kontrolu uvjeta u kojima se sirovine za proizvodnju piva skladište - te metode koje uklanjaju mikotoksine iz piva jednom kad mikotoksini u pivo već dospiju. O takvim metodama dekontaminacije provedeno je nekoliko istraživanja. Te metode uključuju ozonaciju, tretiranje ječma vrućom vodom, te korištenje fungicida, posebnih vrsta kvasaca, bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu i anorganskih adsorbensa.

Prednost ozonacije leži u tome što ne ostavlja rezidualne tvari u proizvodu. Do 96% spora prisutnih na ječmu može biti inaktivirano nakon 5 minuta ako se koristi 0,16 mg ozona po gramu ječma, na

20 °C i pri aktivitetu vode od 0,98, bez da to ima učinak na germinaciju ječma. (Piacentini i sur., 2015; Allen i sur., 2003).

Kottapalli i Wolf-Hall 2008. su proučavali ima li tretiranje ječmenog slada inficiranog plijesnima roda *Fusarium* vrućom vodom učinak na broj gljivica i količinu mikotoksina. Na 45 °C broj gljivica smanjio se za 65-92%, a količina mikotoksina (u ovom slučaju deoksinivalenola) se smanjila za 79-93%.

Bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu, posebice *Lactobacillus* i *Pediococcus*, česti su nepoželjni mikroorganizmi u početnim fazama proizvodnje piva (Suzuki, 2015.). Međutim, starter-kulture takvih bakterija mogu suzbijati kontaminaciju piva gljivicama i mikotoksinima (Halasz i Lasztity, 2009; Lowe i sur, 2004). Oliveira i sur. 2015. su dokazali da *Lactobacillus reuteri* R29 može smanjiti rast plijesni roda *Fusarium* za 23% i proizvodnju deoksinivalenola za 83%.

Kvasci potrebni za fermentaciju (*Saccharomyces cerevisiae*) pokazali su sposobnost djelomične dekontaminacije piva vežući mikotoksine poput aflatoksina B1. U vezanju su učinkovitije bile nevijabilne nego vijabilne stanice kvasca (Shetty i sur., 2007). Kao što je navedeno u uvodu ovog rada, anorganski adsorbensi dodani u pivo tijekom procesa bistrenja također mogu smanjiti koncentraciju mikotoksina u pivu.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu potvrđena je prikladnost korištene analitičke metode za ekstrakciju i detekciju 5-metoksisterigmatocistina. Dobiveni limit detekcije u ovoj metodi iznosi 3,2 µg/mL.

5-metoksisterigmatocistin je detektiran u 27 od 58 analiziranih uzoraka. Ovo je prvi rad koji izvještava o prisutnosti 5-MET-a u pivu, i u nekom prehrambenom proizvodu općenito. Ovi dobiveni rezultati nadovezuju se na radove u kojima je strukturno srodan STC pronađen u prehrambenim proizvodima, kao i na radove u kojima je 5-MET pronađen u vlažnim prašnjavim zatvorenim prostorima. Uvjeti skladištenja sirovina i proizvodnje vjerojatan su uzrok kontaminacije ovim mikotoksinom.

Iako nalazi ovog istraživanja predstavljaju jasan signal za potencijalnu javnozdravstvenu opasnost (prisutnost genotoksičnog i citotoksičnog mikotoksina u široko konzumiranoj vrsti proizvoda), postoji nekoliko ograničenja koja sprečavaju donošenje jasne procjene rizika. Prvo, 5-metoksisterigmatocistin je slabo istražen – nije poznato u kojoj je mjeri štetan ljudskom zdravlju, i koje njegove koncentracije predstavljaju opasnost. Uz to, nekoliko ograničenja tiču se ovog oblika istraživanja. Potrebno je ispitati ove uzorke sofisticiranijom analitičkom metodom, te uzorkovati veći broj što raznolikijih vrsta kako bi se utvrdilo je li kontaminacija 5-MET-om povezana s nekom karakteristikom piva ili njegove proizvodnje.

6. LITERATURA

- Allen B, Wu J, Doan H. Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. *J Environ Sci Health B*. 2003, 38(5), 617-630.
- Banfalvi G. Janus-Faced Molecules against Plant Pathogenic Fungi. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22), 12323.
- Belajová E, Rauová D, Daško L. Retention of ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin. *Eur Food Res Technol*, 2007, 224, 301–308.
- Benkerroum N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(2), 423.
- Bradner WT, Bush JA, Myllymaki RW, Nettleton, Jr. DE, O'Herron FA. Fermentation, Isolation, and Antitumor Activity of Sterigmatocystins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1975, 8(2), 159-163.
- Brown D, Yu JH, Kelkar H, Fernandes M, Nesbitt T, Keller NP, Adams TH, Leonard T. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 1418-1422.
- Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Processing*, 2007, 119, 140-146.
- Busby WF, Wogan GN. Aflatoxins. U: Chemical Carcinogenesis. American Chemical Society, Washington DC, Searle, 1984, 945-1136.
- Cabaret O, Puel O, Botterel F, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxification pathways for 5-methoxy-sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Xenobiotica*, 2014, 44(1), 1-9.
- Cai S, Zhu T, Du L, Zhao B, Li D, Gu Q. Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *J Antibiot*, 2011, 64, 193–196.

- Cao TQ, Liu Z, Dong L, Lee H, Ko W, Vinh LB, Tuan NQ, Kim YC, Sohn JH, Yim JH, Lee DS, Oh H. Identification of Potential Anti-Neuroinflammatory Inhibitors from Antarctic Fungal Strain *Aspergillus* sp. SF-7402 via Regulating the NF- κ B Signaling Pathway in Microglia. *Molecules*, 2022, 27, 2851.
- Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsubé S, Dijksterhuis J, Kim DH, Hong SB, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol*, 2016, 84, 1-118.
- Coffey R, Cummins E, Ward S. Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control*, 2009, 20, 239-249.
- Cox RH, Cole RJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of fungal metabolites, aflatoxins, and sterigmatocystins. *J Org Chem*, 1977, 42, 112-114.
- Creasia DA, Thurman JD, Jones LJ, Nealley ML, York CG, Wannemacher Jr RW, Bunner DL. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 1987, 8, 230-235.
- Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 2002, 127, 19-28.
- Dabelić S, Kifer D, Jakšić D, Kopjar N, Šegvić Klarić M. Sterigmatocystin, 5-Methoxysterigmatocystin, and Their Combinations are Cytotoxic and Genotoxic to A549 and HepG2 Cells and Provoke Phosphorylation of Chk2, but not FANCD2 Checkpoint Proteins. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(7), 464.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 2013, 11, 3254.
- Essery JM, O'Herron FA, McGregor DN, Bradner WT. Preparation and Antitumor Activities of Some Derivatives of 5-Methoxysterigmatocystin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1976, 19(11), 1339-1342.

- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov, 2005, *Syst Appl Microbiol*, 28, 442-453.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect*, 1999, 107, 505-508.
- Halász A, Lásztity R. Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation, *Food Reviews International*, 2009, 25(4), 284-298.
- Huang S, Wang J, Xing L, Shen H, Yan X, Wang J, Zhang X. Impairment of cell cycle progression by sterigmatocystin in human pulmonary cells in vitro. *Food Chem. Toxicol*, 2014, 66, 89–95,
- Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, 167(2), 101-134.
- IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Lyon, IARC, 1976, 10, str. 245–251
- IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to Humans*, 1993, 56, 489-521.
- Jakšić D, Čurtović I, Kifer D, Rašić D, Kopjar N, Micek V, Peraica M, Šegvić Klarić M. Single-Dose Toxicity of Individual and Combined Sterigmatocystin and 5-Methoxysterigmatocystin in Rat Lungs. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(11), 734.
- Jakšić D, Kocsubé S, Bencsik, O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycol. Prog.* 2016, 16, 63–72.

- Jakšić D, Puel O, Canlet C, Kopjar N, Kosalec I, Šegvić Klarić M. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Archives of Toxicology*, 2012, 86(10), 1583-1591.
- Jakšić D, Sertić M, Kifer D, Kocsubè S, Mornar Turk A, Nigović B, Šarkanj B, Krska R, Sulyok M, Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 2021, 31(3), 730-744.
- Jakšić D, Šegvić Klarić M, Crnolatac I, Vujičić NŠ, Smrečki V, Górecki M, Pescitelli G, Piantanida I. Unique Aggregation of Sterigmatocystin in Water Yields Strong and Specific Circular Dichroism Response Allowing Highly Sensitive and Selective Monitoring of Bio-Relevant Interactions. *Mar. Drugs*, 2019, 17, 629.
- Kobayashi N, Kubosaki A, Takahashi Y, Yanai M, Konuma R, Uehara S, Chiba T, Watanabe M, Terajima J, Sugita-Konishi Y. Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Saf (Tokyo)*, 2018, 6, 67-73.
- Kottapalli B, Wolf-Hall CE. Effect of hot water treatments on the safety and quality of *Fusarium*-infected malting barley. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 124(2), 171-178.
- Kunze W. *Technology, Brewing and Malting*. Berlin, Westkreuz-Druckerei Ahrens KG, 2006.
- Low DP, Arendt DK. The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 110(3), 163-180.
- Lu X, Luo C, Xing J, Han Z, Li T, Wu W, Xu H, Zhan R, Chen W. Optimization of storage conditions of the medicinal herb *Ilex asprella* against the sterigmatocystin producer *Aspergillus versicolor* using response surface methodology. *Toxins*, 2018, 10, 499.
- Mori H, Sugie S, Yoshimi N, Kitamura J, Niwa M, Hamasaki T, Kawai K. Genotoxic effects of a variety of sterigmatocystin-related compounds in the hepatocyte/DNA-repair test and the *Salmonella* microsome assay. *Mutation Research*, 1986, 173(3), 217-222.

- Niessen L, Böhm-Schrami M, Vogel H, Donhauser S. Deoxynivalenol in commercial beer - screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research*, 1993, 9(2), 99-109.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103–117
- Nielsen KF, Gravesen S, Nielsen PA, Andersen B, Thrane U, Frisvad JC. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*. 1999, 145(1), 43-56.
- Oliveira P, Brosnan B, Jacob F, Furey A, Coffey A, Zannini E, Arendt EK. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control*, 2015, 51, 444-452.
- Pang VF, Lambert RJ, Felsburg PJ, Beasley VR, Buck WB, Haschek WM. Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry, and immune response. *Fundam Appl Toxicol*, 1988, 11(1), 100-109.
- Pascari X, Ramos AJ, Marin S, Sanchis V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International*, 2018, 103, 121-129.
- Piacentini KC, Savi GD, Pereira MEV, Scussel VM. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.), *Food Chemistry*, 2015, 187, 204-209.
- Piontek M, Łuszczynska K, Lechów H. Occurrence of the Toxin-Producing *Aspergillus Versicolor* Tiraboschi in Residential Buildings. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2016, 13, 862.
- Pleadin J, Kovačević D, Perši N. Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product “Slavonski kulen” during a six-month production process. *Food Control*, 2015, 57, 377-384.
- Pleadin J, Frece J, Markov K. Mycotoxins in food and feed. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2019, 89, 297-345.

- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol*, 2011, 115, 406–420
- Rodricks JV. Fungal Metabolites Which Contain Substituted 7,8-Dihydrofuro[2,3-b] Furans (DHFF) and 2,3,7,8-Tetrahydrofuro[2,3-b] Furans (THFF). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1969, 17, 457-461.
- Rodriguez-Carrasco Y, Fattore M, Albrizio S, Berrada H, Mañes J. Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chemistry*, 2015, 178, 149-155.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. Utrecht, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2011.
- Schulz T, Senkpiel K, Ohgke H. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. *Int J Hyg Environ Health*, 2004, 207, 267–277
- Sforza S, Dall'Astra C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 54-76.
- Shao C, She Z, Guo Z, Peng H, Cai X, Zhou S, Gu Y, Lin Y. ¹H and ¹³C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2007, 45, 434-438.
- Shetty PH, Hald B, Jespersen L. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113(1), 41-46.
- Stroka J, Dasko L, Spangenberg B, Anklam E. Determination of the mycotoxin, sterigmatocystin, by thin-layer chromatography and reagent-free derivatisation. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27, 2101-2111.
- Suzuki K. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. U: *Brewing Microbiology*. Hill AE, urednica, Cambridge, Woodhead Publishing, 2015, 141-173.

- Šegvić Klarić M, Jakšić D, Kocsubé S, Kifer D, Sulyok M, Jelić D, Šarkanj B. Post-flood indoor occurrence of toxigenic Aspergilli from the Versicolores clade: Is it dangerous? *Proceedings of the Romanian Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 26, 12-13
- Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Pieckova E, Pepeljnjak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44, 36–42.
- Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kähkölä P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5), 1899-1904.
- Veršilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136–147.
- Veršilovskis A, De Saeger S, Mikelson V. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin J*, 2008, 1, 161-166.
- Vegi A, Schwarz P, Wolf-Hall CE. Quantification of Tri5 gene, expression and deoxynivalenol production during the malting of barley. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 150(2-3), 150-156.
- Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*, 1999, 424, 167-181.
- Wolf CE, Bullerman LB. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in a aqueous environment. *Food Production*, 1998, 61(3), 365-367.
- Yabe K, Nakamura M, Hamasaki T. Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G- and B-group aflatoxins. *Applied Environ Microbiol*, 1999, 65(9), 3867-3872.

7. SAŽETAK

5-metoksisterigmatocistin (5-MET) je slabo istražen mikotoksin za kojeg je zabilježeno da ima citotoksična i genotoksična svojstva. Strukturno je srodan sterigmatocistinu (STC), zajedno s kojim ga mogu proizvoditi plijesni roda *Aspergillus* serije *Versicolores*. Te su plijesni često prisutne u zatvorenim vlažnim i prašnjavim prostorima. Takvi prostori mogu biti skladišta i proizvodni pogoni u pivovarama. S obzirom na to da je pivo u Hrvatskoj konzumirano u velikim količinama, prisutnost ovih aspergila i biosinteza mikotoksina predstavljaju javnozdravstveni rizik ako je pivo kao krajnji proizvod kontaminirano 5-MET. Za analizu je skupljeno 58 različitih uzoraka piva s hrvatskog tržišta. Ekstrakcija je provedena korištenjem acetonitrila kao otapala, isoljavanjem i propuštanjem uzorka kroz SPE kolonu. Pripremljeni ekstrakti analizirani su tankoslojnom kromatografijom. Stacionarna faza bio je silikagel 60, a mobilna faza smjesa toluena, etil-acetata i mravlje kiseline (90% v/v) u omjeru 5:4:1. Za pojačanje fluorescencije ploče su sušene, grijane i prskane etanolnom otopinom aluminijskoga klorida. Limit detekcije za 5-MET iznosio je 3.2 µg/mL. 5-MET je detektiran u 27 od 58 (46,55%) uzoraka. Njegova prisutnost potvrđena je UV-Vis spektroskopijom nakon ekstrakcije strugotine s TLC ploče. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi nalaz 5-MET u pivu. Također, potvrđuju prikladnost primijenjene metode te predstavljaju signal za potencijalnu javnozdravstvenu opasnost, imajući na umu ogromnu potrošnju piva. Istraživanja koja uključuju veći broj uzoraka te primjenjuju sofisticiranije kromatografske tehnike (poput LC/MS) omogućila bi precizniju interpretaciju ovih rezultata i kvantitativnu analizu 5-MET. Uz to, omogućila bi osjetljiviju detekciju (detekciju 5-MET u manjim koncentracijama) i selektivniju detekciju (s većom razinom sigurnosti da je u pitanju 5-MET a ne neki strukturno srodan spoj).

8. SUMMARY

5-methoxysterigmatocystin (5-MET) is insufficiently investigated cytotoxic and genotoxic mycotoxin. It is structurally related to sterigmatocystin (STC) and produced namely by molds from the genus *Aspergillus*, series *Versicolores*. These molds are frequently found in damp and dusty indoor environments. In beer production, storage and production spaces fit this description. Given the high consumption of beer in Croatia, presence of these *Aspergillus* molds and their production of mycotoxins constitutes a public health risk if beer in its end product state is contaminated with 5-MET. Fifty eight different samples of beer marketed in Croatia were collected for the purposes of this analysis. The extraction was performed by acetonitrile as a solvent, salt-induced precipitation and phase extraction with SPE columns. The prepared extracts were analysed by thin-layer chromatography. Silica gel 60 was used as stationary phase and a 5:4:1 mixture of toluene, ethyl-acetate and formic acid (90% v/v) as mobile phase. To enhance fluorescence, TLC plates were dried, heated and sprayed with an ethanol solution of aluminium chloride. Limit of detection (LOD) for 5-MET was 3.2 µg/mL. 5-MET was detected in 27 of 58 (46,55%) samples. Its presence was confirmed by UV-Vis spectroscopy following the extraction of the spot of interest from the TLC plate. This is the first time 5-MET has been detected in beer. Additionally, this study confirms the suitability of the applied method and serves as a signal for a potential public health risk, considering the high levels of beer consumption. Research that includes a larger number of samples and uses more sophisticated analytic techniques (such as LC/MS) would allow for a more accurate interpretation of these results and enable quantitative analysis. Additionally, it would increase sensitivity (making detection of smaller quantities of 5-MET possible) and selectivity (the likelihood that 5-MET is detected, as opposed to structurally related compounds).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb

Diplomski rad

ISPITIVANJE PRISUTNOSTI 5-METOKSISTERIGMATOCISTINA U PIVU METODOM TANKOSLOJNE KROMATOGRFIJE

Hrvoje Kožić

SAŽETAK

5-metoksisterigmatocistin (5-MET) je slabo istražen mikotoksin za kojeg je zabilježeno da ima citotoksična i genotoksična svojstva. Strukturno je srodan sterigmatocistinu (STC), zajedno s kojim ga mogu proizvoditi plijesni roda *Aspergillus* serije *Versicolores*. Te su plijesni često prisutne u zatvorenim vlažnim i prašnjavim prostorima. Takvi prostori mogu biti skladišta i proizvodni pogoni u pivovarama. S obzirom na to da je pivo u Hrvatskoj konzumirano u velikim količinama, prisutnost ovih aspergila i biosinteza mikotoksina predstavljaju javnozdravstveni rizik ako je pivo kao krajnji proizvod kontaminirano 5-MET. Za analizu je skupljeno 58 različitih uzoraka piva s hrvatskog tržišta. Ekstrakcija je provedena korištenjem acetonitrila kao otapala, isoljavanjem i propuštanjem uzorka kroz SPE kolonu. Pripremljeni ekstrakti analizirani su tankoslojnom kromatografijom. Stacionarna faza bio je silikagel 60, a mobilna faza smjesa toluena, etil-acetata i mravlje kiseline (90% v/v) u omjeru 5:4:1. Za pojačanje fluorescencije ploče su sušene, grijane i prskane etanolnom otopinom aluminijske klorida. Limit detekcije za 5-MET iznosio je 3.2 µg/mL. 5-MET je detektiran u 27 od 58 (46,55%) uzoraka. Njegova prisutnost potvrđena je UV-Vis spektroskopijom nakon ekstrakcije strugotine s TLC ploče. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi nalaz 5-MET u pivu. Također, potvrđuju prikladnost primijenjene metode te predstavljaju signal za potencijalnu javnozdravstvenu opasnost, imajući na umu ogromnu potrošnju piva. Istraživanja koja uključuju veći broj uzoraka te primjenjuju sofisticiranije kromatografske tehnike (poput LC/MS) omogućila bi precizniju interpretaciju ovih rezultata i kvantitativnu analizu 5-MET. Uz to, omogućila bi osjetljiviju detekciju (detekciju 5-MET u manjim koncentracijama) i selektivniju detekciju (s većom razinom sigurnosti da je u pitanju 5-MET a ne neki strukturno srodan spoj).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranica, 12 grafičkih prikaza, 6 tablica i 66 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Aspergillus*, *Versicolores*, mikotoksini, SPE

Mentor: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta..*

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Rašić, *viša znanstvena suradnica s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada*

Rad prihvaćen: veljača 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF 5-METHOXYSTERIGMATOCYSTIN IN BEER BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Hrvoje Kožić

SUMMARY

5-methoxysterigmatocystin (5-MET) is insufficiently investigated cytotoxic and genotoxic mycotoxin. It is structurally related to sterigmatocystin (STC) and produced namely by molds from the genus *Aspergillus*, series *Versicolores*. These molds are frequently found in damp and dusty indoor environments. In beer production, storage and production spaces fit this description. Given the high consumption of beer in Croatia, presence of these *Aspergillus* molds and their production of mycotoxins constitutes a public health risk if beer in its end product state is contaminated with 5-MET. Fifty eight different samples of beer marketed in Croatia were collected for the purposes of this analysis. The extraction was performed by acetonitrile as a solvent, salt-induced precipitation and phase extraction with SPE columns. The prepared extracts were analysed by thin-layer chromatography. Silica gel 60 was used as stationary phase and a 5:4:1 mixture of toluene, ethyl-acetate and formic acid (90% v/v) as mobile phase. To enhance fluorescence, TLC plates were dried, heated and sprayed with an ethanol solution of aluminium chloride. Limit of detection (LOD) for 5-MET was 3.2 µg/mL. 5-MET was detected in 27 of 58 (46,55%) samples. Its presence was confirmed by UV-Vis spectroscopy following the extraction of the spot of interest from the TLC plate. This is the first time 5-MET has been detected in beer. Additionally, this study confirms the suitability of the applied method and serves as a signal for a potential public health risk, considering the high levels of beer consumption. Research that includes a larger number of samples and uses more sophisticated analytic techniques (such as LC/MS) would allow for a more accurate interpretation of these results and enable quantitative analysis. Additionally, it would increase sensitivity (making detection of smaller quantities of 5-MET possible) and selectivity (the likelihood that 5-MET is detected, as opposed to structurally related compounds).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 12 figures, 6 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Aspergillus* mycotoxins, *Versicolores*, SPE

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Rašić, Ph.D. *Senior Scientific Associate*, Institute for Medical Research and Occupational Health

The thesis was accepted: February 2023.