

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Maja Brkić

UTJECAJ DODATKA FULLERENA C₆₀ NA RAZINE AFLATOKSINA U
MEDIJU ZA UZGOJ PLIJESNI *Aspergillus flavus*

diplomski rad

Osijek, studeni, 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Opasnosti vezane uz hranu
Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj 2013./2014. godini održanoj 10. srpnja 2014.
Mentor: prof. dr. sc. *Tomislav Klapac*
Komentor: izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*
Pomoć pri izradi dr. sc. *Tihomir Kovač*
doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*

UTJECAJ DODATKA FULLERENA C₆₀ NA RAZINE AFLATOKSINA U MEDIJU ZA UZGOJ PLIJESNI *Aspergillus flavus* *Maja Brkić, 185-DI*

Sažetak: Nanočestice fullerena se zbog svojih specifičnih svojstava sve više uvode u proizvode široke potrošnje zbog čega postoji i velika vjerojatnost njihovog ispuštanja u okoliš, pa tako i interakcije sa sveprisutnom plijesni *Aspergillus flavus*. Najmanje istraženo područje antimikrobnog učinka nC₆₀ je na plijesni koje proizvode mikotoksine. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj nanočestica fullerena C₆₀ na produkciju aflatoksina kod plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251. Plijesan je uzgojena u tekućoj YES podlozi, u tami, pri temperaturi od 29 °C tijekom 168 sati. Nanočestice fullerena dodane su u koncentracijama od 10 i 100 ng mL⁻¹. Rezultati su pokazali da obje koncentracije nanočestica fullerena imaju antiaflatoksikogeni učinak na plijesan *A. flavus*. Uočeni antiaflatoksikogeni utjecaj mogao bi se pripisati sniženju razine oksidativnog stresa u stanicama plijesni.

Ključne riječi: *Aspergillus flavus*, aflatoksin B1, nanočestice, fuleren C₆₀

Rad sadrži: 30 stranica
8 slika
2 tablice
0 priloga
33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>	predsjednik
2.	prof. dr. sc. <i>Tomislav Klapac</i>	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	član-komentor
4.	izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i>	zamjena člana

Datum obrane: 20. studenog 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31 000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Foodborne hazards

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. X held on July 10th 2014

Mentor: *Tomislav Klapac*, PhD, prof.

Comentor *Ivica Strelec*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Tihomir Kovač*, PhD, assistant
Bojan Šarkanj, PhD, assistant prof.

THE EFFECT OF FULLERENE C₆₀ ON THE LEVEL OF AFLATOXINS IN AN *Aspergillus flavus* GROWTH MEDIUM

Maja Brkić, 185-DI

Summary: Fullerene nanoparticles are increasingly being used in commercial products because of their specific characteristics, which is why there is a great possibility of their environmental release where they could interact with the ubiquitous fungi *Aspergillus flavus*. The least researched field of antimicrobial influence of nC₆₀ involves mycotoxin producing fungi. The aim of this graduate thesis was to examine the influence of fullerene C₆₀ nanoparticles on the production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* NRRL 3251. The fungi was grown in liquid YES media during 168 hours at 29 °C in the dark. Fullerene nanoparticles were added at concentrations of 10 and 100 ng mL⁻¹. The results indicated that both concentrations of fullerene nanoparticles had an antiaflatoxicogenic influence on *A. flavus*, which might be due to the decrease of oxidative stress in the fungal cells.

Key words: *Aspergillus flavus*, aflatoxin B1, nanoparticles, fullerene C₆₀

Thesis contains: 30 pages
8 figures
2 tables
0 supplements
43 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Tomislav Klapac</i> , PhD, prof. | mentor |
| 3. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof. | co-mentor |
| 4. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: November 20th 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Aspergillus flavus	4
2.1.1. Mikroskopske i makroskopske značajke	4
2.1.2. Životni ciklus	6
2.1.3. Patogenost.....	7
2.2. AFLATOKSINI	8
2.3. FULERENI.....	12
2.3.1. Struktura	12
2.3.2. Svojstva i primjena	13
2.4. LC-MS/MS	15
3. Eksperimentalni dio	17
3.1. ZADATAK.....	18
3.2. MATERIJAL I METODE	18
3.2.1. Priprema suspenzije nanočestica fulerena C ₆₀	18
3.2.2. Karakterizacija suspenzije nanočestica fulerena C ₆₀	18
3.2.3. Uzgoj plijesni Aspergillus flavus	18
3.2.4. Analiza aflatoksina na LC-MS/MS-u	19
4. Rezultati i rasprava.....	21
4.1. KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJE NANOČESTICA FULERENA	22
4.2. UTJECAJ DODATKA NANOČESTICA FULERENA NA RAZINE AFLATOKSINA	23
5. Zaključci	26
6. Literatura.....	28

1. UVOD

Plijesan *Aspergillus flavus* vrlo je rasprostranjena u okolišu i često kontaminira primarne poljoprivredne proizvode tijekom uzgoja, žetve i skladištenja. Ova vrsta plijesni proizvodi termostabilne toksine zvane aflatoksini koji su prema IARC-u (Međunarodna agencija za istraživanje raka) uvršteni u skupinu 1 karcinogena za ljude. Najznačajniji aflatoksini su B1, B2, G1, G2 te njihovi metaboliti M1 i M2 koji se najčešće nalaze u mlijeku životinja koje su izložene aflatoksinima B1 i B2 hranom (Kensler i sur., 2011). Kako se zbog globalnog zatopljenja predviđa sve veća kontaminacija aflatoksinima u svijetu, uključujući i Europu (Battilani i sur., 2012), potrebno je pronaći mjere kojima će se njihova biosinteza minimizirati. S obzirom na sve veću primjenu nanotehnologije općenito, primjenu je pronašla i u prehrambenom sektoru i to u vidu pametnih ambalaža, funkcionalne hrane te opreme u proizvodnji. Zbog velike primjene nanočestica nameće se i pitanje njihovog širenja u okolišu i mogućeg utjecaja na ljude. Stoga je cilj ovog rada ispitati utjecaj nanočestica fullerena na biosintezu aflatoksina plijesni *A. flavus*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Aspergillus flavus*

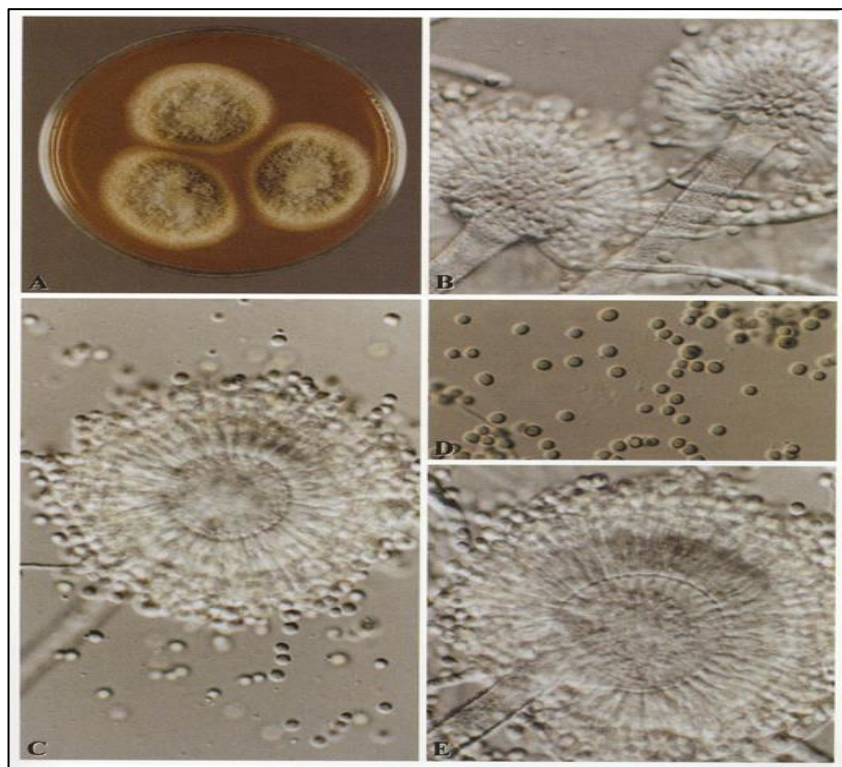
Aspergillus flavus Link. je vrsta iz carstva Gljiva (Fungi), odjeljka Ascomycota, razreda Eurotiomycetes, reda Eurotiales, porodice Trichocomaceae, roda *Aspergillus* (Klich, 2007). Široko je rasprostranjena u prirodi zbog sposobnosti raspršivanja spora zrakom i rasta gotovo svugdje, uz uvjet dostupnosti odgovarajućih hranjivih tvari. Ova plijesan je najčešće prisutna u tlu, posebice tropskih i suptropskih područja, stočnoj hrani, truloj vegetaciji, uskladištenim sjemenkama i žitaricama te raznim vrstama prehrambenih proizvoda. Također, patogene su za kukce, više životinje, uključujući i čovjeka (Raper i Fennell, 1965). *A. flavus* kontaminira primarne poljoprivredne proizvode u polju, tijekom žetve, skladištenja i tijekom obrade. Razmnožava se prvenstveno aseksualno dijeljenjem micelija ili germinacijom spora.

Plijesan *A. flavus* prirodno raste u pojasu iznad 25° sjeverne i južne zemljopisne širine, s visokom pojavnošću između 26° i 35° geografske širine, dok je to rijetkost u širinama iznad 45° (Klich, 2007). Temperature pogodne za rast variraju od 10 do 48,8 °C s optimumom od 33,8 °C. Prema Klichu (2007), optimalan aktivitet vode (a_w) kreće se između 0,85 i 0,99, iako postoje podaci da može rasti i pri a_w od 0,73 (Battilani i sur., 2012). Rast plijesni *A. flavus* je moguć pri pH vrijednostima u rasponu od 2,1 – 11,2, a optimalno pri 7,5 (Duraković i Duraković, 2000). Većinu životnog ciklusa postoji u obliku micelija, a u nepovoljnim uvjetima (kao što je suša) u obliku sklerocija i spora što plijesni omogućava da lako nadvlada druge organizme u borbi za hranu. Prezimljava u obliku micelija ili sklerocija. Poboljšanjem okolišnih uvjeta sklerocij počinje klijati i nastavlja se proces rasta hifa ili proizvodi spore koje se dalje šire tлом i zrakom (Hedayati i sur., 2007).

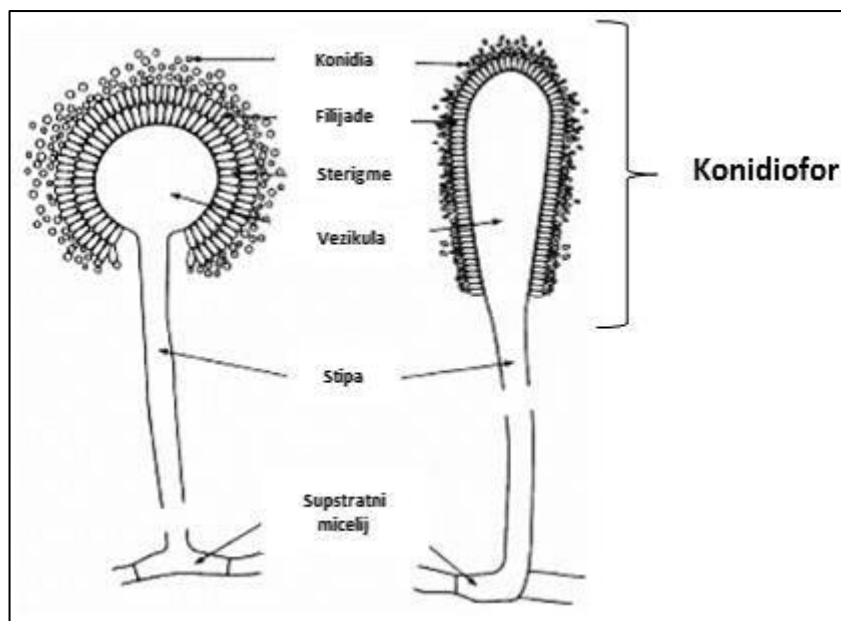
2.1.1. Mikroskopske i makroskopske značajke

Vrsta *A. flavus* uzgojena u aerobnim uvjetima *in vitro* na Czapekovom agaru s kvaščevim ekstraktom (CYA) pri temperaturi od 25°C stvara žutozeleno pigmentirane kolonije (**Slika 1**). Nakon inkubacije od 7 dana na 25°C kolonije obično narastu od 6 do 7 cm. Često ima radialne prstenove, ispočetka žute, ali starenjem postaju svijetlo do tamnosmeđi. Građa konidiofora prikazana je na **Slici 2**. Konidiofori se nalaze na površini ili blizu površine hifa, duljine 400 µm – 1 mm ili dulje, bezbojne su ili svijetlo-smeđe s hrapavim stijenkama. Stipe su najčešće duljine od 400 do 800 µm, s hrapavom stijenkom. Vezikule su okrugle ili sferične, obično promjera od 20 do 45 µm. Vezikule nose metule i fialide koje su sličnih dužina od 7 –

10 μm . Konidije su sferične do polusferične, promjera 3,5 – 5 μm s relativno tankom stijenkom, najčešće lagano naborane ili rjeđe glatke (Battilani i sur., 2012; Bennett, 2010; Hedayati i sur., 2007; Klich, 2007). Sklerocije proizvodi oko 50 % izolata, koje su isprva bijele boje i postepeno otvrdnjavaju mijenjajući boju u crveno-smeđu do crnu. Sklerocij je otporna struktura micelija sastavljena od gustog spleta hifa oko kojih se nalazi membrana koja se stvara u nepovoljnim uvjetima i može se održati dugi niz godina. Na temelju obilježja proizvedenih sklerocija, izolati *A. flavus* se mogu podijeliti u dvije fenotipske vrste. „S soj“ proizvodi brojne male sklerocije (prosječni promjer < 400 μm), „L soj“ proizvodi manji broj većih sklerocija. Unutar S soja, neki izolati, nazvani SB, biosintetiziraju samo B aflatoksine, dok drugi, pod nazivom SBG, biosintetiziraju i B i G aflatoksine. L soj biosintetizira samo B aflatoksine, dok G aflatoksine uopće ne biosintetizira (Hedayati i sur., 2007; Payne i sur., 2008).



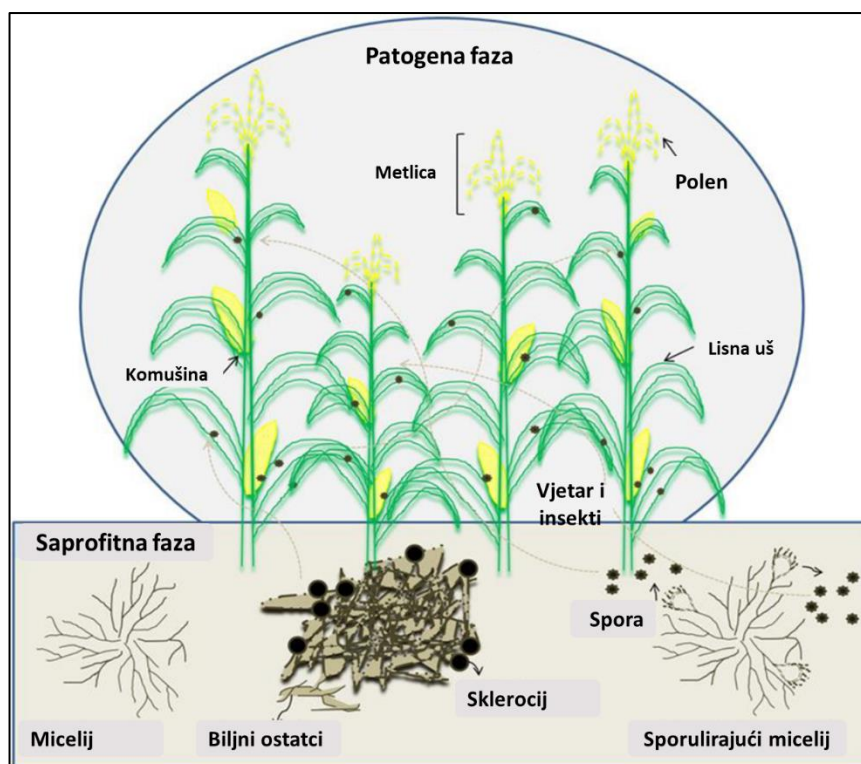
Slika 1 Kolonije *A. flavus* nakon sedam dana inkubacije (A), konidiofor (B, C, E), konidije (D)
(*Aspergillus* and *Aspergillosis* website, 2017)



Slika 2 Građa konidiofora plijesni *A. flavus* (Klich, 2007)

2.1.2. Životni ciklus

Plijesan *A. flavus* može preživjeti i kolonizirati tlo i organski supstrat biljnog podrijetla. Zbog preživljavanja u nepovoljnim uvjetima lako nadvlada druge organizme za supstrate u tlu ili na biljci. *A. flavus* može prezimiti na biljnim ostacima u obliku micelija ili sklerocija, koji služe kao izvor novih konidija kako bi se ponovno započeo ciklus infekcije na novoj kulturi. Glavni čimbenici koji utječu na populaciju ove plijesni u tlu su temperatura i vlaga tla (Battilani i sur., 2012). Životni ciklus ove plijesni, prikazan na **Slici 3**, odvija se u dvije faze: kolonizacija biljnih ostataka u tlu i infekcija biljnog tkiva iznad površine tla. Kada se dostignu povoljni uvjeti, sklerocij i konidije koje su prezimile klijaju u micelij. Novonastali micelij proizvodi mnogobrojne konidije i otpušta ih u zrak gdje se prenose pomoću insekata ili vjetrom. Zatim započinje kolonizacija i infekcija svježeg posijanog usjeva. Insekti i vjetar su podjednako povezani s rasprostranjivanjem plijesni *A. flavus*. Čimbenici koji također utječu na infekciju su i količina spora na polju i osjetljivost biljke na infekciju (ovisno o vrsti i zdravstvenom statusu biljke), agrotehničkim mjerama i prisutnim insektima. Oštećenja usjeva kukcima mogu utjecati na konačnu koncentraciju mikotoksina jer je rast plijesni ovisan o vlazi na usjevu (Battilani i sur., 2012).



Slika 3 Shematski prikaz ciklusa infekcije kukuruza s plijesni *A. flavus* (prilagođeno iz Lakkireddy i sur, 2014)

Sve dok je vlaga zrna ispod 32% na kukuruznom klipu neće biti značajne infekcije. Nakon infekcije i porasta micelija, produkcija aflatoksina se može nastaviti sve do vlage zrna od 15%. Ako dođe do oštećivanja zrna nakon pada vlage u zrnu na količinu pri kojoj rast plijesni nije podržan, ne očekuje se ponovni rast plijesni i pojava mikotoksina osim ako se zrno naknadno ne rehidratira. Osim napada insekata bitno je i tempiranje žetve. Što je žetva kasnija to se očekuje više aflatoksina u usjevima, tim više ako se preklopi s kišnim razdobljem netom prije ili tijekom žetve. Vrsta *A. flavus* može inficirati zrna i nakon žetve što je isključivo povezano s prisutnošću plijesni na polju. Ukoliko se sušenje ne provede adekvatno, u silosu mogu nastati džepovi s višom vlagom zrna što stvara centre za kontaminaciju. U uskladištenom zrnu, najvažniji abiotski faktor koji utječe na rast plijesni i razvoj mikotoksina su aktivitet vode, temperatura i sastav atmosfere u kojoj se čuva zrno te prisutnost ostalih mikroorganizama (Battilani i sur., 2012).

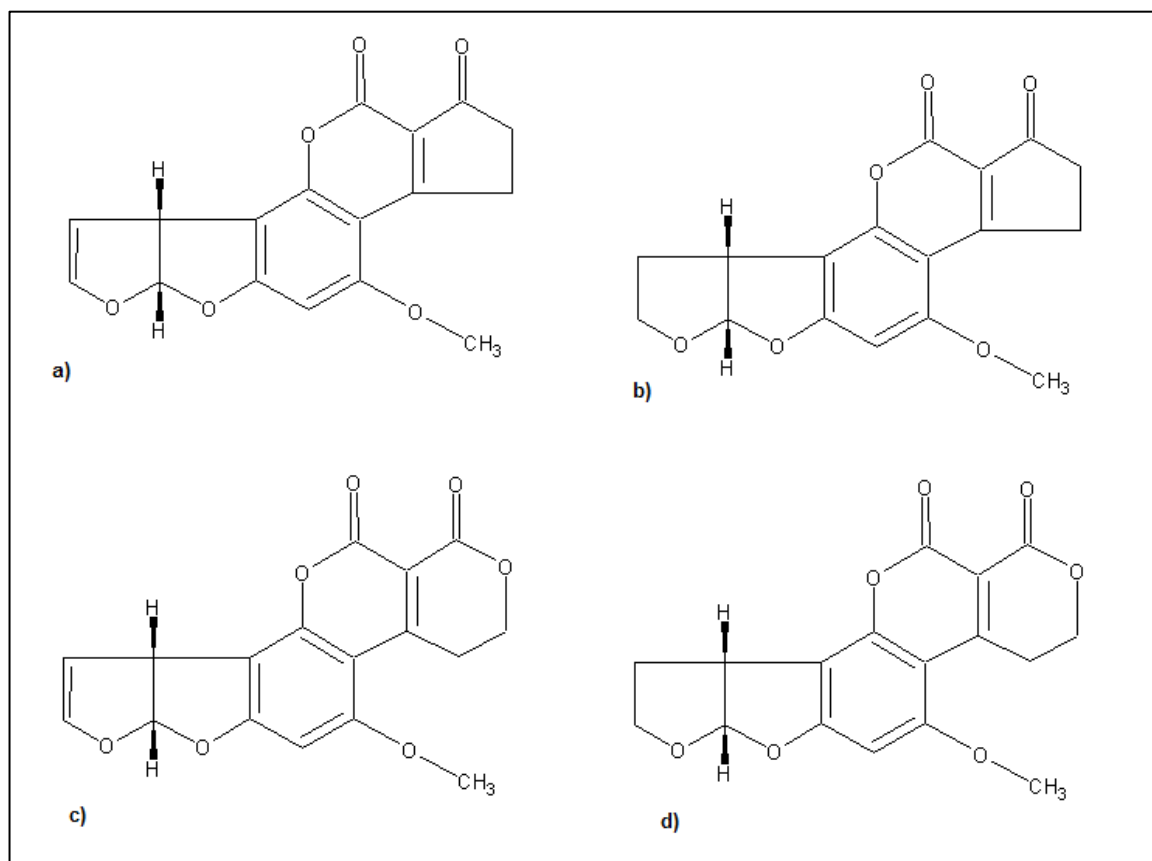
2.1.3. Patogenost

A. flavus je patogen za biljke, kukce i životinje te čovjeka. Plijesni roda *Aspergillus* su među najčešćim plijesnima u okolišu, često se nalaze u raspadajućoj vegetaciji (u gomilama

komposta), na izolacijskom materijalu, u uređajima za zagrijavanje/hlađenje zraka ili odvodima toplana, u kirurškim dvoranama i bolesničkim sobama, na bolničkim uređajima i na česticama prašine u zraku. Invazivne infekcije obično nastaju udisanjem spora ili, katkad, direktnim prodorom kroz oštećenu kožu. Rana istraživanja invazivnih aspergiloza kod imunonekompromitiranih miševa su pokazala da je *A. flavus* virulentniji od gotovo svih drugih *Aspergillus* vrsta, osim vrste *A. tamarii*. Jasno je da aflatoksin nije glavni čimbenik u razvoju bolesti, budući da su sojevi koji ne mogu biosintetizirati aflatoksine *in vitro* slične virulencije (Hedayati i sur., 2007). Kao patogen za ljude postao je bitan zbog izuzetne podložnosti imunokompromitiranih osoba. *A. flavus* uzrokuje širok spektar bolesti, od alergijskih reakcija do invazivnih infekcija. Nakon *A. fumigatus*, *A. flavus* je drugi vodeći uzročnik invazivne i neinvazivne aspergiloze te najčešći uzročnik invazivne ekstrapulmonalne bolesti. Također može uzrokovati kroničnu plućnu aspergilozu, alergijsku pulmonarnu aspergilozu, fungalni endokarditis, kronični granulomatozni sinusitis, keratitis (Hedayati i sur., 2007). Smrtnost od infekcija aspergilama je relativno visoka jer je ograničen broj dostupnih antifungalnih lijekova (amfotericin B, vorikonazol, itrakonazol, kaspofungin) te su identificirani i rezistentni sojevi (Hedayati i sur., 2007; MSD, 2010).

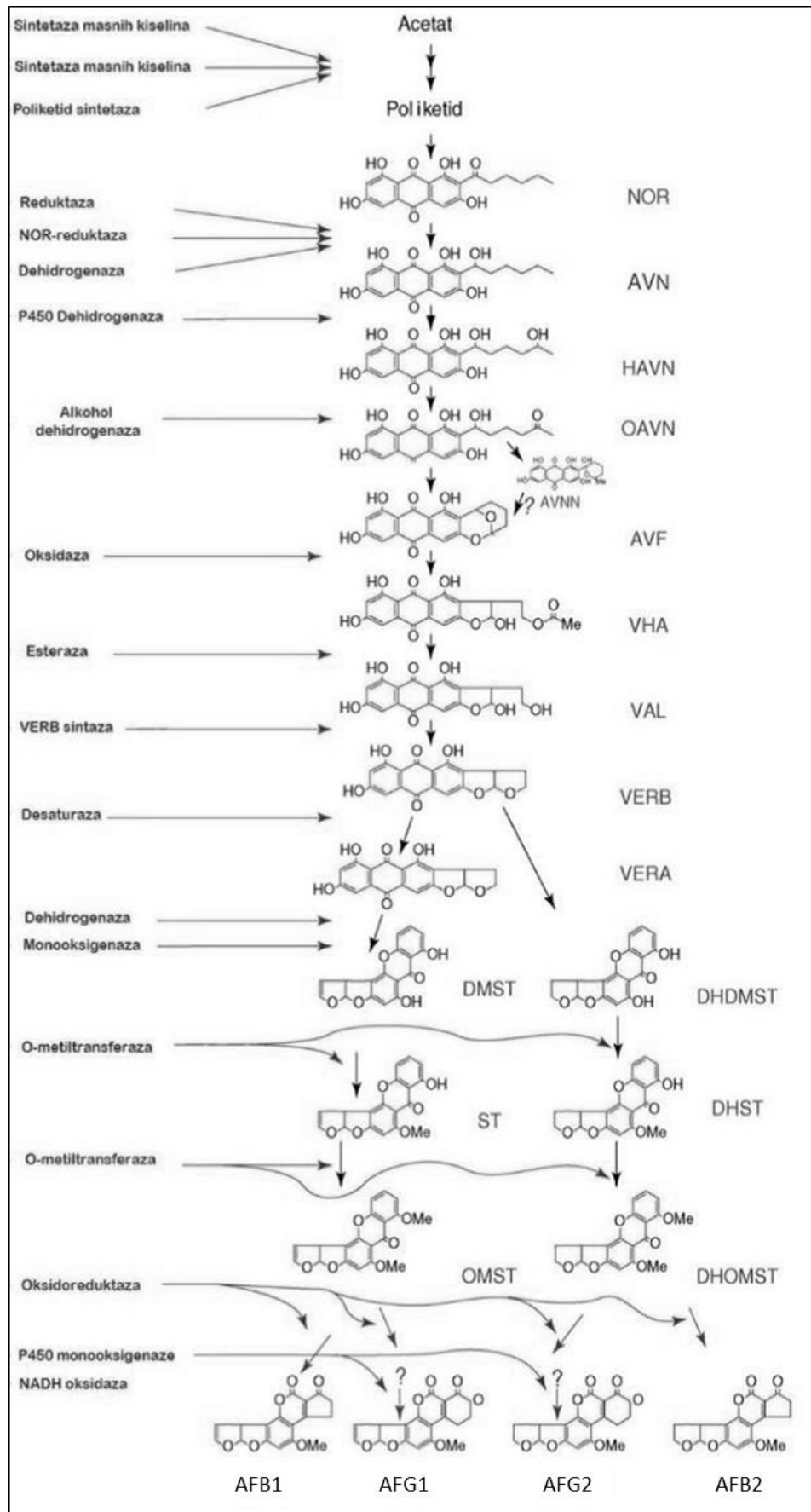
2.2. AFLATOKSINI

Aflatoksini su sekundarni metaboliti, prvenstveno *A. flavusa* i *A. parasitica*, ali i drugih vrsta plijesni roda *Aspergillus*. Postoje četiri najznačajnija aflatoksina: B1, B2, G1, G2 (**Slika 4**) te njihovi hidroksilirani derivati M1 i M2. To su lipofilni, termostabilni spojevi, osjetljivi na UV-svjetlo (ultraljubičasto) i upravo po karakterističnoj plavoj ili zelenoj fluorescenciji pod UV-zračenjem su i dobili imena. Prvi put su identificirani kao uzrok „X“ bolesti purana kada je 1960. u Engleskoj uginulo više od 100 000 purana, pačica i fazana koji su pojeli hranu kontaminiranu s plijesni *A. flavus*. Aflatoksini prema IARC-u spadaju u skupinu 1 dokazanih karcinogena za ljude, a ciljni organ koji napadaju je jetra. Najčešće kontaminiraju kukuruz, manioku, chilli, kikiriki, sjemenke pamuka, kakao, orašaste plodove, pšenicu, sjemenke suncokreta, proso, grah, slanetak, grašak, leću i rižu. Općenito je prihvaćeno da sojevi vrste *A. flavus* proizvode samo AFB1 (aflatoksin B1), AFB2 (aflatoksin B2), ciklopijazoničnu kiselinu (CPA), 3-nitropropionsku kiselinu (3-NPA), aspergilinsku kiselinu i kojičnu kiselinu (KA). Procjenjuje se da je oko 4,5 milijardi ljudi u zemljama u razvoju kronično izloženo velikim količinama ovih toksina (Williams i sur., 2004).



Slika 4 Strukturne formule AFB1 (a), AFB2 (b), AFG1 (c), AFG2 (d)

(prilagođeno iz Lakkireddy i sur., 2014)



Slika 5 Biosinteza aflatoksina (prilagođeno iz Cleveland i sur., 2009)

Aflatoksini su sekundarni produkti metabolizma što znači da nastaju sporednim biokemijskim putevima u stacionarnoj fazi rasta plijesni (idiofazi) nakon završenog eksponencijalnog rasta (trofofaze). Put biosinteze aflatoksina je proučavan više od 50 godina i jedan je od najdetaljnije ispitanih puteva sekundarnog metabolizma plijesni. Biosintetski put aflatoksina može se podijeliti u tri dijela, pri čemu u prvom dijelu dolazi do stvaranja osnovne strukture aflatoksina, od acetyl-CoA do norsolorinske kiseline (NOR) (prvog stabilnog metabolita) (**Slika 5**), drugi dio čini transformaciju NOR-a do versikolorina B (VERB) i zadnji dio je oblikovanje i transformacija ogranaka do aflatoksina B1, B2, G1 i G2 (Šarkanj, 2014).

Na biosintezu aflatoksina kod aflatoksikogenih sojeva plijesni utječu mnogi biotski i abiotski čimbenici, uključujući nutritivne čimbenike poput izvora ugljika i dušika kao i okolišne čimbenike poput aktiviteta vode, temperature, ali i fiziološke uvjete poput pH te bioaktivne tvari. Točan utjecaj pojedinog faktora na molekularnoj razini se još uvijek proučava u znanstvenim istraživanjima (Yu, 2012).

Od nutritivnih faktora, prisutnost jednostavnih ugljikohidrata poput glukoze, saharoze, maltoze, inducira nastanak aflatoksina, dok pepton, sorboza ili laktoza inhibiraju. Međutim, mehanizmi kojima prisutni ugljik regulira ekspresiju gena na putu biosinteze aflatoksina nisu sasvim jasni (Yu, 2012). Izvor dušika je također važan kod proizvodnje aflatoksina. Asparagin, aspartat, alanin, amonijev nitrat, amonijev nitrit, amonijev sulfat, glutamat, glutamin i prolin u podlozi podržavaju biosintezu aflatoksina, dok natrijev nitrat i natrijev nitrit ne podržavaju biosintezu aflatoksina kod plijesni vrste *A. flavus* (Yu, 2012).

Optimalna temperatura za proizvodnju aflatoksina je oko 30 °C (raspon maksimalne proizvodnje aflatoksina varira od 28 °C do 35 °C, ovisno o autoru, podlozi i vrsti producenta) (Sweeney i Dobson, 1998; Yu, 2012). Kod temperatura iznad 36 °C produkcija aflatoksina gotovo potpuno prestaje. Minimalni a_w potreban za biosintezu aflatoksina plijesni *A. flavus* je 0,82 i to je najniži a_w potreban za biosintezu aflatoksina od svih *Aspergillus* vrsta (Sweeney i Dobson, 1998). Biosinteza aflatoksina povezana je s promjenama pH. Biosinteza aflatoksina u plijesni *A. flavus* se odvija u kiselom mediju, dok ju alkalni medij inhibira (Yu i sur., 2012). Raspon pH vrijednosti unutar kojeg se sintetiziraju aflatoksini je između 3,5 i 8,0, s optimumom koji varira od autora do autora. Također, poznato je da plijesni reagiraju na svjetlo modulacijom diferencijacije i sekundarnog metabolizma (Bennett i sur., 1981), pri čemu je utjecaj svjetla na proizvodnju aflatoksina ovisan o temperaturi. Kod 20 i 25 °C

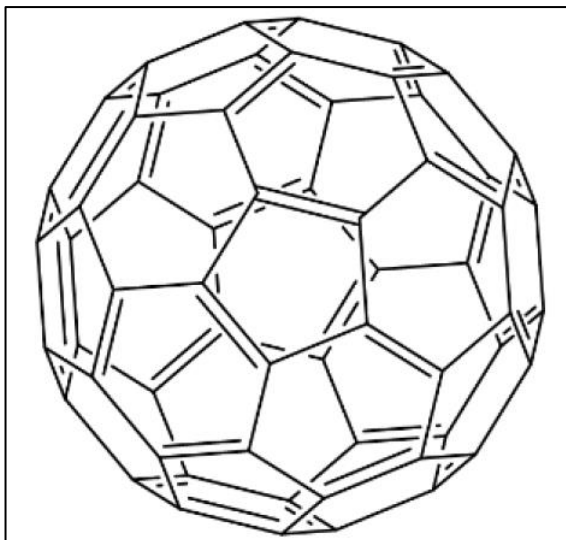
proizvedeno je više aflatoksina uz prisustvo svjetla, dok je pri 30 °C više aflatoksina proizvedeno u mraku. Ujedno, svjetlo je generator ROS-ova (reaktivnih vrsta kisika), a oni potiču biosintezu aflatoksina (Reverberi i sur., 2010).

2.3. FULERENI

Fulereni predstavljaju treću alotropsku modifikaciju ugljika. To su sferični zatvoreni kavezi ugljika u obliku pravilnih poliedara, koji se sastoje od različitog broja ugljikovih atoma (C_{20} , C_{60} , C_{80} , C_{90}). Povijest ugljikovih nanostrukture počinje otkrićem tzv. buckminsterfulerena 1985. godine. Od tog trenutka broj otkrivenih struktura stalno raste, a C_{60} fulereni su jedni od najistraživanijih.

2.3.1. Struktura

Najpoznatiji i najstabilniji među fulerenima je buckminsterfuleren, sferična molekula sa 60 ugljikovih atoma, promjera 0,7 nm, koja je dobila naziv u čast arhitektu Buckminsteru Fulleru na čije geodezijske kupole oblikom podsjeća fuleren (Talbot, 1999). Molekula fulerena sadrži 12 peterokutnih i 20 šesterokutnih ploha (**Slika 6**) gdje je svaki atom ugljika kroz sp^2 hibridizaciju povezan sa susjedna tri atoma, što uzrokuje i dodatnu interakciju između valentnih elektrona i π -elektrona. U ovom slučaju postoje dva tipa karakterističnih valentnih veza: C5–C5 jednostruke veze u peterokutima i C5–C6 dvostruke veze u šesterokutima čije su dužine $r(C5-C5) = 0,1458$ nm i $r(C5-C6) = 0,1401$ nm. Raspodjela elektronske gustoće unutar molekula C_{60} je takva da u unutrašnjosti molekula postoji rupa u elektronskoj gustoći, s druge strane, nesimetrična raspodjela elektronske gustoće po ugljikovim vezama u peterokutima i šesterokutima uzrokuje i elektronske struje u njima, koje određuju magnetna svojstva molekula C_{60} . Svi stabilni fulereni podliježu pravilu izoliranog peterokuta koje kaže da nijedan peterokut ne smije imati zajednički brid (Marković i Trajković, 2008; Talbot, 1999). Iako ima 60 jednostrukih i 30 dvostrukih naizmjeničnih veza, sadrži malo π delokaliziranih elektrona zbog čega pokazuje slaba aromatična svojstva.



Slika 6 Struktura molekule C_{60} (Kovač, 2017)

2.3.2. Svojstva i primjena

Iako je do otkrića i proizvodnje fullerenskih nanočestica došlo u zadnja tri desetljeća, isti se spojevi pojavljuju i prirodno. Fulereni su pronađeni na mjestima udara groma, kraterima meteorita, u određenim vrstama stijena (fulgurit i šungit). Mogu nastati nepotpunim izgaranjem organske tvari u šumskim požarima ili u motorima s unutarnjim izgaranjem. Međutim, u okolišu se ne akumuliraju u visokim koncentracijama što navodi na zaključak kako postoji način njihove prirodne razgradnje (Chae i sur., 2014). Razvoj masovne proizvodnje fulerena počeo je kada su Kratschmer i Huffman 1990. godine otkrili metodu pripreve pomoću električnog luka. U električnom luku se napačuje grafitna elektroda uz helij kao zaštitni plin, a nakon toga se iz čađe na stijeni reaktora izoliraju nastali fulereni (Talbot, 1999).

Ovi ugljikovi spojevi posjeduju jedinstvena svojstva zahvaljujući strukturi kaveza i poliaromatičnosti. Njihovi delokalizirani elektroni im omogućavaju da prenose naboj. Fotosjetljivi su, zbog čega proizvode singlet kisik (1O_2) uslijed izloženosti vidljivim ili UV zrakama. Za nanotehnologiju je također važno svojstvo da atom (posebice metala) može biti smješten unutar fullerenske lopte (postoji sferičan prazan prostor unutar ugljikovog kaveza promjera 0,4 – 1 nm za fulerene C_{60} do C_{240}) i takvi su spojevi vrlo reaktivni što im omogućava da djeluju kao katalizatori. Svojstva nano- C_{60} (nC_{60}) se razlikuju od onih čistog

C_{60} . nC_{60} je kristalan, a veličina čestica može biti od 10 nm do preko 300 nm u promjeru (Lyon i sur., 2005).

U usporedbi sa čistim oblikom, funkcionalizirani fulereni imaju veću mogućnost primjene zbog svoje povećane topljivosti u vodi, ali i drugačijih svojstava od čistog C_{60} . Objavljeno je da funkcionalizirani fulereni smanjuju oksidativni stres gašenjem reaktivnih vrsta kisika što bi značilo da imaju antioksidativna svojstva. Također, C_{60} fulereni i njihovi vodotopljivi derivati izazvali su brigu zbog sve veće proizvodnje i mogućih posljedica na okoliš i zdravlje čovjeka. Funkcionalizirani fuleren koji je u velikoj mjeri proučavan je polihidroksifuleren (PHF, fulerol ili fulerenol) koji ima 12 - 42 hidroksilne skupine što povećava topljivost molekule. Dokazano je da i PHF inducira nastanak reaktivnih vrsta kisika, uzrokuje oštećenja u mikrosomima jetre štakora i citotoksičan je za ljudske epitelne stanice (Gao i sur., 2011).

Jedno od biološki najbitnijih svojstava C_{60} je sposobnost sakupljanja slobodnih radikala bolje od konvencionalnih antioksidansa zbog delokalizirane π dvostruke veze unutar fullerenskog kaveza. Također, ozračivanje C_{60} vidljivim ili UV zrakama potiče njegov prelazak u tripletno pobuđeno stanje i kasniji prijenos energije na molekularni kisik stvarajući tako visoko reaktivni 1O_2 . Dvojno svojstvo C_{60} da ili hvata ili stvara ROS-ove moglo bi se iskoristiti za njegov razvoj kao citoprotektora ili antikarcinogenog/anitimikrobnog sredstva (Marković i Trajković, 2008).

Strukturne i kemijske razlike u nC_{60} uzrokuju i razlike u reaktivnosti. Koloidni agregati fulerena u vodi (aqC_{60}) proizvode vrlo malo ili čak uopće ne proizvode ROS-ove iako imaju kvantni prinos 1O_2 blizu jedan. Prema Chae i sur. (2010) manji C_{60} aglomerati više su hidroksilirani što na koncu rezultira većim potencijalom za tvorbu ROS-a, a time i većom toksičnošću za bakterije i viruse. Primijećen je nastanak 1O_2 u svim uzorcima, s time da je utvrđeno da se smanjenjem veličine agregata smanjuje antioksidativni učinak. Mali stupanj inaktivacije MS2 bakteriofaga u mraku sugerira da bi nC_{60} s česticama promjera manjeg od 450 nm i 220 nm mogao utjecati na bakteriju nevezano uz tvorbu ROS, direktnom oksidacijom. Uz ozračivanje UV-A zrakama pokazalo se da nC_{60} s promjerom manjim od 450 nm i 220 nm značajno inaktivira bakteriju *E. coli* K12. Transmijskom elektronskom mikroskopijom *E. coli* K12 i MS2 bakteriofaga uočeno je oštećenje stanične membrane, čestice nC_{60} bile su vidljive na površini stanice i u peptidoglikanskom sloju. Suprotno tome, Haddock i sur. (2010) nisu uspjeli dokazati inhibiciju rasta *E. coli* niti *S. cerevisiae* u uvjetima u

kojima je izbjegnut mogući utjecaj organskih otapala na rezultate. Također, Hossain i sur. (2013) smatraju da je jedini način inaktivacije bakterija direktni kontakt nC_{60} sa stanicom.

Prema Lyon i sur. (2008), ROS nisu uzrok toksičnosti fulerena s obzirom da u provedenom istraživanju nema dokaza oksidacije proteina te nC_{60} (otopljen u vodi dugotrajnim miješanjem) pokazuje antibakterijska svojstva i u odsustvu svjetlosti i kisika. Nadalje, pretpostavljaju da nC_{60} djeluje oksidativno na stanicu što dovodi do oksidativnog stresa, neovisno o nastanku ROS-ova.

Da li će fulereni imati prooksidativno ili antioksidativno djelovanje uvelike ovisi o svojstvu nanočestica, eksperimentalnim uvjetima i vrsti ispitivanog mikroorganizma ili kulturi stanica ili tkiva (Kovač, 2017). Tako Johnston i sur. (2010) smatraju da na toksičnost fulerena utječu kemijska struktura, površinske modifikacije i postupak pripreme. Navedeno se odražava na vodotopivost fulerena koja je povezana s antioksidativnim ili prooksidativnim svojstvima. Općenito, čini se kako se povećanjem vodotopivosti smanjuje njegov toksični učinak.

2.4. LC-MS/MS

Tradicionalni detektori za tekućinsku kromatografiju mogu biti elektrokemijski, fluorescentni, i UV-VIS (ultraljubičasto i vidljivo svjetlo) detektori. Neki od ovih generiraju dvodimenzionalne podatke kod kojih podaci predstavljaju intenzitet signala kao funkciju vremena. Drugi generiraju trodimenzionalne podatke. Trodimenzionalni podaci uključuju ne samo intenzitet signala, već i zasebne kromatograme za svaku odabranu tranziciju. Maseni spektrometri također generiraju trodimenzionalne podatke koji osim intenziteta signala, generiraju podatke masenog spektra koji mogu pružiti vrijedne informacije o molekularnoj težini, strukturi, identitetu, količini i čistoći uzorka (Agilent Technologies, 2001).

Maseni spektrometar može se podijeliti na tri osnovna dijela: izvor ionizacije, analizator i detektor. Uzorak mora biti uveden u izvor ionizacije instrumenta. Tamo molekule uzorka postaju ionizirane, jer se ionima lakše manipulira nego s neutralnim molekulama. Nastali ioni se zatim prosljeđuju u regiju analizatora gdje se ioni razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Odvojeni ioni se detektiraju i taj signal se šalje u sustav baze podataka.

Metoda uvođenja uzorka izvoru ionizacije često ovisi o načinu ionizacije i o vrsti i složenosti uzorka. Uzorak se može umetnuti izravno u izvor ionizacije, odnosno u slučaju LC-MS/MS-a

(spregnute tehnike tekućinske kromatografije i masene spektrometrije) prije ionizacije razdvajanje analita se provodi na tekućinskoj kromatografiji. Kod ovog načina uvođenja uzorka maseni spektrometar je spojen izravno na HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti), a time je uzorak podijeljen u niz komponenti koje se zatim unose u maseni spektrometar za analizu određene komponente.

Glavna funkcija analizatora mase je razdvajanje formiranih iona u izvoru ionizacije masenog spektrometra prema omjeru mase i naboja. Trenutno je dostupno mnogo različitih masenih analizatora.

MS/MS maseni spektrometri su instrumenti koji imaju više od jednog analizatora, obično dva. Analizatori mogu biti iste ili različite vrste. MS/MS se koristi za izradu strukturnih informacija o spoju fragmentirajući određene ione uzorka unutar masenog spektrometra te za identificiranje fragmentiranih iona. Te informacije se zatim mogu zajedno složiti da se dobiju strukturne informacije netaknute molekule, kao i njena koncentracija (Ashcroft, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj rada bio je ispitati utjecaj nanočestica fulerena C₆₀ na produkciju aflatoksina kod plijesni *Aspergillus flavus*.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema suspenzije nanočestica fulerena C₆₀

Suspenzija nanočestica fulerena pripremljena je prema Lyon i sur. (2006). Odvazi od 200 mg fulerena C₆₀ čistoće 99,9% (Sigma Aldrich) dodano je 500 mL ultračiste vode uz brzinu dodavanja od 1 L/min. Suspenzija je zaštićena od svjetla, postavljena na magnetsku mješalicu i miješana tijekom 30 dana pri 550 o/min. Po isteku 30 dana suspenzija je podvrgnuta ultrazvučnoj obradi u ultrazvučnoj kupelji tijekom jednog sata uz polusatno hlađenje otopine nakon 30 minuta ultrazvučne obrade. U svrhu uklanjanja većih aglomerata otopina je filtrirana kroz Whatman filter papir No. 1 (veličina pora 11 µm), a iz dobivenog filtrata su potom uklonjene nanočestice veće od 450 nm filtracijom kroz injekcijski filter Chromafil Xtra PA 45/25 (veličina pora 0,45 µm). U tako pripremljenom filtratu određena je koncentracija fulerena mjerenjem apsorbancije otopine pri 336 nm. Apsorbancija suspenzije fulerena preračunata je u koncentraciju na osnovi baždarnog dijagrama pripremljenog s različitim koncentracijama fulerena u toluenu.

3.2.2. Karakterizacija suspenzije nanočestica fulerena C₆₀

Suspenzija nanočestica fulerena karakterizirana je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS) te metodom elektroforetskog rasipanja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS). DLS je upotrijebljen za određivanje hidrodinamičkog promjera nanočestica u vodenim suspenzijama nanočestica fulerena, a ELS za određivanje naboja površine nanočestica (zeta potencijala). Za izvođenje analiza korišten je uređaj Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

3.2.3. Uzgoj plijesni *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus NRRL 3251 (iz zbirke plijesni Katedre za biokemiju i toksikologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Osijeku) uzgojen je prema Gandomiju i

suradnicima (2009) u tekućoj YES podlozi (eng. *yeast extract sucrose*, agar s kvaščevim ekstraktom i saharozom). Inkubacija plijesni je provedena pri temperaturi od 29 °C na orbitalnoj tresilici s 200 okretaja u minuti tijekom 168 sati. Koncentracija nanočestica fulerena nC_{60} u mediju za uzgoj je iznosila 10 i 100 ng mL⁻¹. Uzorci su izuzimani svaka 24 sata uzgoja u vremenu od 48 do 168 sati, budući da je masa poraslog micelija nakon 24 sata uzgoja bila manja od 0,01 mg. Micelij je od medija za uzgoj odvojen filtracijom kroz nabrani filter papir, a koncentracija produciranih aflatoksina u mediju za uzgoj je određena LC-MS/MS metodom.

3.2.4. Analiza aflatoksina na LC-MS/MS-u

Podloga odvojena od micelija je filtrirana kroz 0,22 µm injekcijski filter, a filtrat je razrijeđen s 20%-tnom vodenom otopinom acetonitrila (omjer razrjeđenja 1:9). Analiza je izvršena na AB SCIEX-ovom uređaju API 2000 s trostrukim kvadrupolom i elektrosprejnim izvorom (ESI) prema uvjetima prikazanim u **Tablicama 1 i 2**. Odvajanje je izvršeno na HPLC-u pomoću Ascentis Express C18 kolone, dimenzija 15 cm x 4,6 mm, punjenja 2,7 µm. Kolona je termostatorirana na 40 °C uz protok od 100 µL min⁻¹ i injekcijski volumen od 20 µL. Mobilna faza A je AcN (acetonitril): H₂O = 95 : 5 s dodatkom 2 mM HCOONH₄, a pokretna faza B H₂O s dodatkom 2 mM HCOONH₄.

Tablica 1 Uvjeti ionizacije aflatoksina na ESI izvoru

Kapilarni napon	3,5 kV
Plin za otparavanje	Dušik, 650 L Hr ⁻¹ , 400 °C
Deklasterirajući plin	Dušik, 10 L Hr ⁻¹
Temperatura izvora	150 °C
akvizicija	MRM način, praćenje višestrukih reakcija
Kolizijski plin	Argon pri 3,7x10 ⁻³ mbar

Tablica 2 Tranzicije i pripadajući MS/MS uvjeti za analizu aflatoksina

Spoj	Tranzicije iona (m/z)	Zadržavanje uvjeta (ms)	Potencijal deklasteriranja (V)	Energija kolizije (V)
AFB1	313>285	5	60	23
	313>241	5	60	38
AFB2	315>259	5	60	30
	315>287	5	60	25
AFG1	329>243	5	60	28
	329>259	5	60	24
AFG2	331>313	5	60	24
	331>245	5	60	28

4. REZULTATI I RASPRAVA

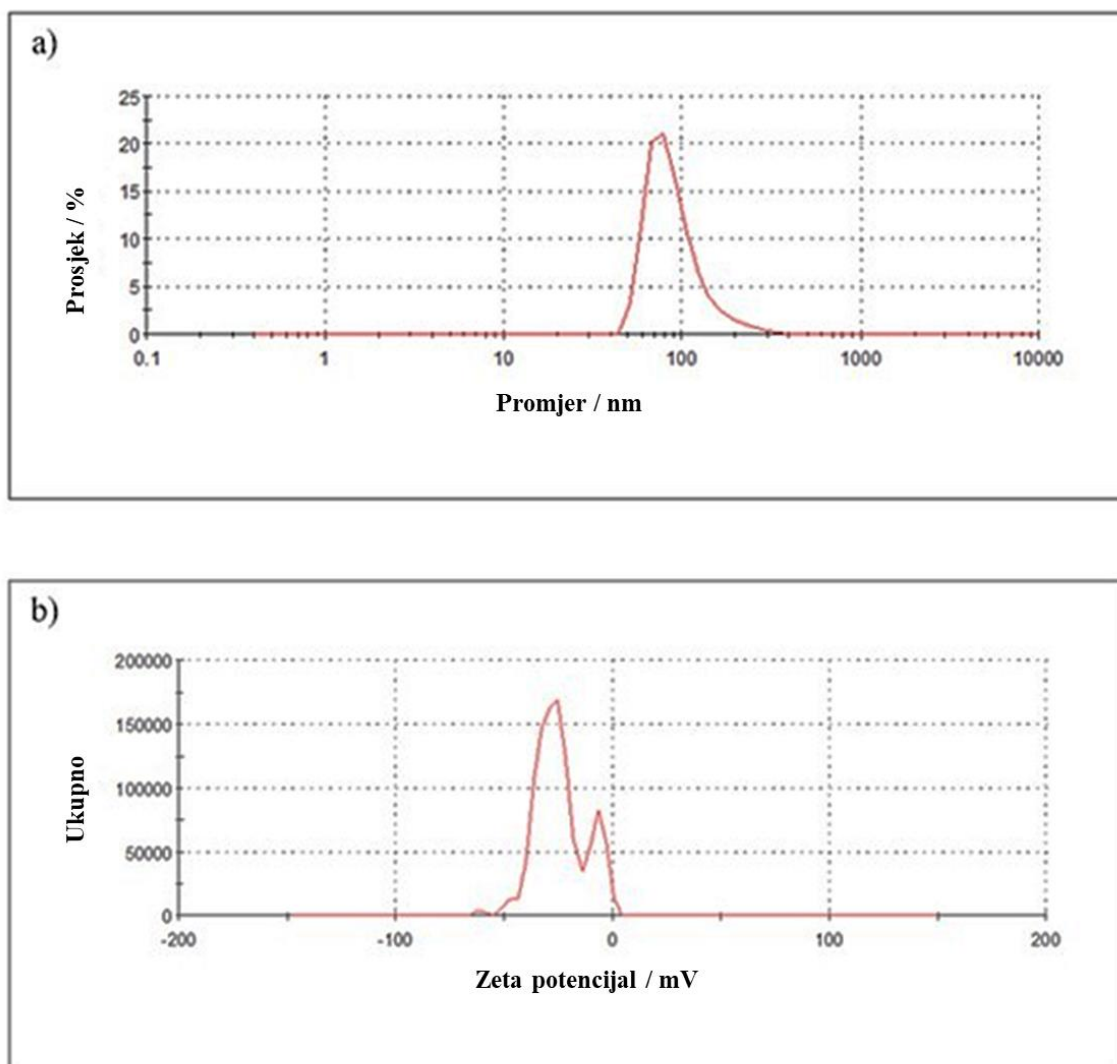
Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj nanočestica fullerena C_{60} na produkciju aflatoksina plijesni *A. flavus* NRRL 3251. Nanočestice fullerena se zbog svojih specifičnih svojstava sve više uvode u proizvode široke potrošnje zbog čega postoji i velika vjerojatnost njihovog ispuštanja u okoliš (Hotze i sur., 2008). Iz navedenog razloga provode se istraživanja njihovog utjecaja na različite biološke sustave. Utvrđeno je da nC_{60} direktno oksidira stanice *E. coli* K12 (Chae i sur., 2010; Hossain i sur., 2008), pokazuje toksičnost neovisno o stvaranju ROS (Marković i Trajković, 2008; Lyon i sur., 2008), potpuno inhibira rast *B. subtilis* i *E. coli* (Fortner i sur., 2005). Također, pripremom suspenzije čestica fullerena navedenom u poglavlju 3.2.1. izbjegnut je mogući utjecaj ostataka otapala na rezultate.

Najmanje istraženo područje antimikrobnog učinka nC_{60} je na plijesni koje proizvode mikotoksine. Jedna od tih plijesni je sveprisutna *A. flavus*, patogena za biljke, kukce, životinje i ljude, koja proizvodi aflatoksine. Zbog velike rasprostranjenosti plijesni *A. flavus* velika je vjerojatnost interakcije s nC_{60} u okolišu.

Rezultati ovog rada se mogu podijeliti u dva dijela - karakterizacija suspenzije nanočestica fullerena i utjecaj nanočestica fullerena na razine aflatoksina.

4.1. KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJE NANOČESTICA FULLERENA

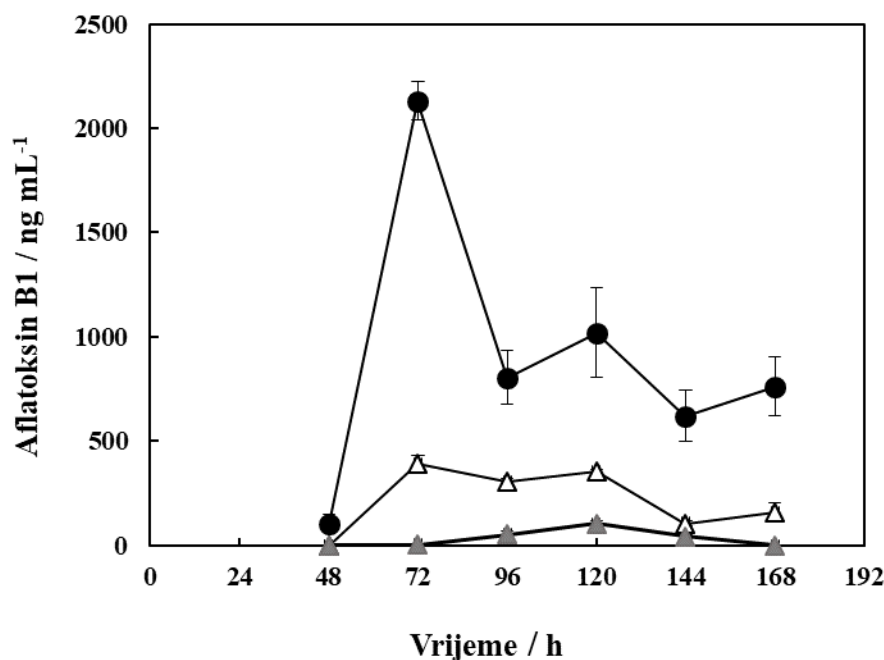
Prema preporuci Europske komisije (2011/696/EU), nanomaterijali se definiraju kao prirodne, slučajno ili namjerno proizvedene tvari koje sadrže minimalno 50% ukupnih čestica vanjskog promjera između 1 i 100 nm, a mogu biti pojedinačne, kao agregati ili aglomerati. Karakterizacija nanočestica fullerena provedena je da bi se utvrdilo odgovaraju li njihove dimenzije navedenoj definiciji. Određivanje hidrodinamičkog promjera provedeno je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Određen je i zeta potencijal nanočestica fullerena metodom elektroforetskog rasipanja svjetlosti. Rezultati su pokazali da 62,5% nanočestica fullerena ima hidrodinamički promjer manji od 100 nm što znači da se prema definiciji Europske komisije dobivene čestice mogu smatrati nanočesticama. Srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera nC_{60} iznosila je 78 nm, a zeta potencijala -24,5 mV. Analiza neovisno pripremljenih suspenzija nanočestica pokazuje ujednačenost pripreme s obzirom na rezultat. Dobivene vrijednosti prikazane na **Slici 7** slične su literaturnim (Fortner i sur., 2005; Lyon i sur., 2006).



Slika 7 Karakterizacija nanočestica fulerena a) prosječni hidrodinamički promjer, b) zeta potencijal

4.2. UTJECAJ DODATKA NANOČESTICA FULERENA NA RAZINE AFLATOKSINA

Utjecaj dodatka nC_{60} u koncentracijama od 10 i 100 $ng\ mL^{-1}$ na proizvodnju aflatoksina određen je u tekućoj YES podlozi inokuliranoj s plijesni *A. flavus* NRRL 3251. Uzgoj plijesni proveden je u tami kako bi se simulirao rast plijesni u tlu, gdje je najčešće prisutna. Detektirani su AFB1 i AFB2, dok su koncentracije AFG1 i AFG2 bile ispod limita detekcije. S obzirom da je poznato da *A. flavus* ne proizvodi AFG1 i AFG2, njihova prisutnost nije ni bila očekivana u ispitivanim uzorcima. Koncentracija aflatoksina određivana je svaka 24 sata počevši od 48. sata.



Slika 8 Utjecaj nanočestica fullerena na proizvodnju aflatoksina plijesni *A. flavus* tijekom 168 sati uzgoja. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm SEM 3 neovisna uzgoja.

Legenda: ● - kontrolni uzgoj, △ - 10 ng mL⁻¹, ▲ - 100 ng mL⁻¹

Usporedba utjecaja dvije različite koncentracije nanočestica fullerena C₆₀ na proizvodnju aflatoksina tijekom perioda uzgoja prikazana je na **Slici 8**. Jasno je vidljivo da koncentracija nC₆₀ od 100 ng mL⁻¹ ima veći antiaflatoksikogeni učinak od koncentracije od 10 ng mL⁻¹. Najveći antiaflatoksikogeni učinak koncentracija od 10 ng mL⁻¹ imala je tijekom prvih 96 sati za vrijeme kojih je koncentracija aflatoksina smanjena za 70 do 75% u odnosu na kontrolni uzgoj. Tijekom prvih 48 sati vidljivo je da nema proizvodnje aflatoksina, što bi moglo biti povezano s prilagodbom plijesni na podlogu. Nakon 96 sati uočena je slabija inhibicija proizvodnje aflatoksina u iznosu od 22 do 63%. Koncentracija fullerena C₆₀ od 100 ng mL⁻¹ pokazuje značajnu inhibiciju aflatoksina tijekom cijelog perioda uzgoja. U prva 72 sata, kada je proizvodnja aflatoksina maksimalna, inhibicija iznosi 99%, a ostatak vremena u rasponu od 62 do 100%.

Rezultati određivanja utjecaja nC₆₀ na proizvodnju aflatoksina plijesni *A. flavus* tijekom 168 sati uzgoja u tekućoj YES podlozi navode na zaključak da nanočestice fullerena značajno utječu na produkciju aflatoksina B1. Pri tome treba naglasiti kako ostale vrste aflatoksina nisu zabilježene, kako u kontrolnom uzgoju tako i u uzgoju uz prisutnost nC₆₀. Prema dostupnoj literaturi, produkcija aflatoksina B1 se pojačava uslijed izloženosti plijesni

pojačanom oksidativnom stresu (Jayashree i Subramanyam, 2000; Narasaiah i sur., 2006; Reverberi i sur., 2008). Međutim, prema Reverberiju i sur. (2005) sniženje oksidativnog stresa u stanicama plijesni može biti posljedica antioksidativnog djelovanja različitih tvari. Stoga bi se uočeni antiaflatoksigeni učinak nC₆₀ mogao pripisati sniženju razine oksidativnog stresa u stanicama plijesni.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom diplomskom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Dugotrajnim miješanjem fulerena C_{60} u ultračistoj vodi može se pripremiti suspenzija nanočestica fulerena C_{60} ;
2. Nanočestice fulerena pokazuju antiaflatoksikogeni učinak na plijesan *A. flavus* NRRL 3251 pri koncentracijama nC_{60} od 10 i 100 $ng\ mL^{-1}$ tijekom uzgoja;
3. nC_{60} pri koncentraciji od 100 $ng\ mL^{-1}$ pokazuju antiaflatoksikogeni učinak u rasponu od 62 do 100% ovisno o vremenu inkubacije, dok je isti učinak pri 10 $ng\ mL^{-1}$ najviše 75%.

6. LITERATURA

- Agilent Technologies: *Basics of LC/MS Primer*. Agilent Technologies, SAD, 2001.
- Aoshima H, Kokubo K, Shirakawa S, Ito M, Yamana S, Oshima T: Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol Science* 14:69-72, 2009.
- Ashcroft AE: An introduction to mass spectrometry. *University of Leeds*, 2011.
- Aspergillus & Aspergillosis Website: *Aspergillus flavus*. 2013 <http://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-flavus-31> [29.09.2017]
- Battilani P, Rossi V, Giorni P, Pietri A, Gualla A, van der Fels-Klerx HJ, Booij CJH, Moretti A, Logrieco A, Miglietta F, Toscano P, Miraglia M, De Santis B, Brera C: Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA, 2012.
- Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Camardo Leggieri M, Brera C, Rortais A, Goumperis T, Robinson T: Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports* 6:24328, 2016.
- Bennett JW: An overview of the genus *Aspergillus*. U *Aspergillus: molecular biology and genomics*, str. 1-18. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010.
- Bennett JW, Klich MA: *Aspergillus*. U *Encyclopedia of Bioprocess Technology Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, str. 213-220. John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- Chae SR, Badireddy AR, Farmer Budarz J, Lin S, Xiao Y, Therezien M, Wiesner MR: Heterogeneities in Fullerene Nanoparticle Aggregates Affecting Reactivity, Bioactivity, and Transport. *ACS Nano* 4:5011-5018, 2010.
- Chao TC, Song G, Hansmeier N, Westerhoff P, Herckes P, Halden RU: Characterization and Liquid Chromatography-MS/MS Based Quantification of Hydroxylated Fullerenes. *Analytical Chemistry* 83:1777-1783, 2011.
- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, Bennett JW: Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 27:151-157, 2009.
- Duraković L, Delaš F, Blažinkov M, Šećerkadić L, Frece J, Redžepović S, Bošnjak M, Skelin A, Duraković Z, Duraković S: Aflatoxin Accumulation During the Growth of Mould *Aspergillus flavus* ATCC 26949 on Corn in Pure and Mixed Culture as Related to Various Temperature and Moisture Content. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 5:10-17, 2010.
- EFSA, European Food Safety Authority: Technical report Aflatoxins (sum B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal derived food products, EFSA, Parma, Italy, 2013.
- Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB: C60 in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response. *Environmental Science & Technology* 39:4307-4316, 2005.

Gao J, Wang Y, Folta KM, Krishna V, Bai W, Indeglia P, Georgieva A, Nakamura H, Koopman B, Moudgil B: Polyhydroxy fullerenes (fullerols or fullerenols): Beneficial effects on growth and lifespan in diverse biological models. *Plos One* 6:e19976, 2011.

Gelderman MP, Simakova O, Clogston JD, Patri AK, Siddiqui SF, Vostal AC, Simak J: Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis in vitro, *International Journal of Nanomedicine* 3:59–68, 2008.

Hadduck AN, Hindagolla V, Contreras AE, Li Q, Bakalinsky AT: Does aqueous fullerene inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* or *Escherichia coli*?. *Applied and Environmental Microbiology* 76:8239-8242, 2010.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW: *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677-1692, 2007.

Hotze EM, Labille J, Alvarez P, Weisner MR: Mechanisms of photochemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water. *Environmental Science & Technology* 42:4175-4180, 2008.

Jayashree T, Subramanyam C: Oxidative stress a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine* 29:981-985, 2000.

Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Aschberger K, Stone V: The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity. *Toxicological sciences* 114:162-182, 2010.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD: Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological sciences* 120:s28-s48, 2011.

Klich MA: Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health* 25:657-667, 2009.

Kovač T: Modulacija oksidativnog stresa plijesni *Aspergillus flavus* nanočesticama fulerena. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2017.

Lakkireddy K, Kasturi K, Sambasiva Rao KRS: Aflatoxins in Food and Feed: The Science of Safe Food. Research & Reviews: Journal of Food Science & Technology. 3:6-11.2014

Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJJ: Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. *Environmental Science & Technology* 40:4360-4366, 2006.

Lyon DY, Fortner JD, Sayes CM, Colvin VL, Hughes JB: Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C₆₀ water suspension. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2757-2762, 2005.

Lyon DY, Brunet GW, Wiesner MR, Alvarez PJJ: Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC₆₀) is not due to ROS-mediated damage. *Nano Letters* 8:1539-1543, 2008.

Marković Z, Todorović-Marković B, Kleut D, Nikolić N, Vranješ-Đurić S, Misirkić M, Vučićević Lj, Janjetović K, Isaković A, Harhaji Lj, Babić-Stojić B, Dramičanin M, Trajković D: The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes. *Biomaterials* 28:5437-5448, 2007.

Marković Z, Trajković V: Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). *Biomaterials* 29:3561-3573, 2008.

MSD: Priručnik dijagnostike i terapije. Placebo, Split, 2010.

Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C: Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 162:179-189, 2006.

Oberdörster E: Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives* 112:1058-1062, 2004

Payne GA, Brown MP: Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual review of phytopathology* 36:329-362, 1998.

Pycke BFG, Chao TC, Herckes P, Westerhoff P, Halden RU: Beyond nC60: strategies for identification of transformation products of fullerene oxidation in aquatic and biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404:2583-2595, 2012.

Raper KB, Fennel DI: *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1965.

Reverberi M, Fabbri AA, Zjalić S, Ricelli A, Punelli F, Fanelli C: Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 69:207-215, 2005.

Reverberi M, Punelli M, Smith CA, Zjalić S, Scarpari M, Scala V, Cardinali G, Aspate N, Pinzari F, Payne GA, Fabbri AA, Fanelli C: How peroxisomes affect aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Plos One* 7:e48097, 2012.

Sweeney MJ, Dobson ADW: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43:141-158, 1998.

Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na produkciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Talbot C: Fullerene and nanotube chemistry: an update. *School Science Review* 81:37-48, 1999.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D: Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:1106-1122, 2004.

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