

Utjecaj nanočestica fulerenola na sekundarni metabolizam plijesni *Aspergillus flavus* tijekom uzgoja uz izloženost VIS svjetlu

Antunović, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:985703>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Martina Antunović

**UTJECAJ NANOČESTICA FULERENOLA NA SEKUNDARNI
METABOLIZAM PLIJESNI *ASPERGILLUS FLAVUS* TIJEKOM UZGOJA UZ
IZLOŽENOST VIS SVJETLU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva**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 godini 2019./2020. održanoj 21. rujna 2020.

Mentor: dr. sc. Tihomir Kovač**Komentor:** doc. dr. sc. Ante Lončarić**Utjecaj nanočestica fulerenola na sekundarni metabolizam plijesni *Aspergillus flavus* tijekom uzgoja uz izloženost VIS svjetlu**

Martina Antunović, 4010/15

Sažetak:

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (FNP) na rast plijesni *A. flavus* NRRL 3251 te na njen sekundarni metabolizam. Plijesan je uzgajana u tekućoj YES (eng. *Yeast Extract Sucrose*; hrv. ekstrakt kvasca - saharoza) podlozi tijekom 168 sati pri 29 °C u tami ili uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama. Također, korištene su sljedeće koncentracije nanočestica fulerenola: 10, 100 i 1000 ng mL⁻¹.

Rezultati ukazuju na to da je od primijenjenih koncentracija nanočestica fulerenola jedino koncentracija od 1000 ng mL⁻¹ utjecala na povećanje biomase plijesni. Nadalje, uočeno je kako prisutnost nanočestica fulerenola nema utjecaja na rast spora plijesni. Nanočestice fulerenola utječu na sintezu aflatoksina B1 i B2. Koncentracija od 1000 ng mL⁻¹ nanočestica fulerenola ima anafiaflatoksikogeni učinak.

Ključne riječi: *Aspergillus flavus*, sekundarni metabolizam, aflatoksini, fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, VIS svjetlo**Rad sadrži:** 34 stranica
19 slika
1 tablica
0 priloga
77 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | | |
|----|------------------------------|---------------|
| 1. | doc. dr. sc. Tihana Marček | predsjednik |
| 2. | dr. sc. Tihomir Kovač | član-mentor |
| 3. | doc. dr. sc. Ante Lončarić | član |
| 4. | doc. dr. sc. Antun Jozinović | zamjena člana |

Datum obrane: 30. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD**DIPLOMSKI RAD**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 18, HR-31000 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 of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held on September 21, 2020.**Mentor:** Tihomir Kovač, PhD**Comentor:** Ante Lončarić, PhD, assistant prof.**Fullerol Nanoparticles and VIS Illumination Impact on *Aspergillus flavus* Secondary Metabolism**

Martina Antunović, 4010/15

Summary:

The aim of this paper was to examine the influence of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles on growth and secondary metabolism of *A. flavus* NRRL 3251. The fungi was grown in liquid YES (Yeast Extract Sucrose) media during 168 hours at 29 °C in the dark or VIS light exposure in the 12 hours darkness/12 hours light regime. Also, the following concentrations of fullereneol nanoparticles were used: 10, 100 and 1000 ng mL⁻¹.

From different applied concentrations, the results indicate that only concentration of 1000 ng mL⁻¹ fullereneol nanoparticles had effect on increase of mold biomass. Furthermore, it was observed that the presence of fullereneol nanoparticles had no effect on the growth of mold spores. Fullereneol nanoparticles have impact on synthesis of aflatoxin B1 and aflatoxin B2. Concentration of 1000 mg mL⁻¹ fullereneol nanoparticles have an antiaflatoxicogenic effect.

Key words: *Aspergillus flavus*, Secondary Metabolism, aflatoxins, fullereneol C₆₀(OH)₂₄, VIS light**Thesis contains:** 34 pages
19 figures
1 tables
0 supplements
77 references**Original in:** Croatian**Defense committee:**

- | | | |
|----|---------------------------------------|--------------|
| 1. | Tihana Marček, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. | Tihomir Kovač, PhD | supervisor |
| 3. | Ante Lončarić, PhD, assistant prof. | member |
| 4. | Antun Jozinović, PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: September 30, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

"Čovječe

pazi da ne ideš malen

ispod zvijezda!"...

A.B.Šimić

Najprije zahvaljujem svom mentoru, dr.sc. Tihomiru Kovaču na nesebičnom pružanju znanja i strpljenju. Također, zahvaljujem ostalim djelatnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek na svakoj riječi i gesti pomoći.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima te bratu na безусловnoj ljubavi i podršci kroz sve ove godine.

Zahvaljujem se prijateljicama koje su uz mene bile u dobru i zlu, u teškim ispitnim rokovima te veselim studentskim izlascima.

Zahvaljujem se svom dečku na razumijevanju, ljubavi i potpori. Hvala ti za svaku lijepu riječ i osmijeh.

Hvala vam, za sve!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ASPERGILLUS FLAVUS	4
2.1.1. Građa stanica <i>A.flavus</i>	5
2.1.2. Životni ciklus <i>A.flavus</i>	7
2.2. AFLATOKSINI - SVOJSTVA I BIOSINTEZA	8
2.3. FULERENI	10
2.3.1. Struktura fulerena C ₆₀	11
2.3.2. Zastupljenost fulerena C ₆₀ u okolišu i primjena.....	12
2.3.3. Fulerenol C ₆₀ (OH) ₂₄	12
2.3.4. Antimikrobni učinak nanočestica fulerena C ₆₀ i fulerenola C ₆₀ (OH) ₂₄	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ZADATAK	16
3.2. MATERIJALI I METODE	16
3.2.1. Kemikalije.....	16
3.2.2. Sinteza fulerenola, priprava i karakterizacija suspenzije nanočestica	16
3.2.3. Rast plijesniti određivanje broja spora	16
3.2.4. Određivanje koncentracije sekundarnih metabolita plijesni <i>A.flavus</i>	17
3.2.5. Obrada i prikaz rezultata	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJE NANOČESTICA FULERENOLA	20
4.2. UTJECAJ NANOČESTICA FULERENOLA NA RAST PLIJESNI <i>A. FLAVUS</i>	21
4.3. UTJECAJ NANOČESTICA FULERENOLA NA BROJ SPORA PLIJESNI <i>A. FLAVUS</i> U PODLOZI ZA UZGOJ	22
4.4. UTJECAJ NANOČESTICA FULERENOLA NA SEKUNDARNI METABOLIZAM PLIJESNI <i>A. FLAVUS</i>	23
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	29

Popis oznaka, kratica i simbola

AF	Aflatoksin
NOR	Norsolorinska kiselina
AVN	Averantin
HAVN	Hidroksiaverantin
OAVN	Oksoaveratin
AVNN	Averufanin
AVF	Averufin
VOH	Versikonol
VHA	Versikonal hemiacetal acetat
VERB	Versikolorin B
DMST	Dimetilsterigmatocistin
OMST	O-metilsterigmatocistin
DHOMST	Dihidro-O-metilsterigmatocistin
ATP	Adenozin trifosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
FNP	Nanočestice fullerena
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid

1. UVOD

Plijesni roda *Aspergillus* široko su rasprostranjene. Pri povoljnim okolišnim uvjetima kontaminacija hrane ovom plijesni dovodi do mnogih zdravstvenih, ali i ekonomskih problema. Pri tome dolazi do aktivacije sekundarnog metabolizma prilikom čega nastaju sekundarni metaboliti male molekulske mase toksični pri niskim koncentracija, odnosno mikotoksini. Sekundarni metaboliti plijesni roda *Aspergillus* koji privlače najviše pažnje nazivaju se aflatoksini. Najznačajniji pripadnik skupine jest aflatoksin B1 koji zbog svoje visoke toksičnosti istražuje od samog otkrića. Hoće li se biosinteza aflatoksina odvijati i kojim intenzitetom, ovisi o okolišnim faktorima te prisutnosti raznih spojeva. Kao jedan od mogućih regulatora sekundarnog metabolizma, a za koji ne postoji dovoljno podataka je fuleren, odnosno njegov hidroksilirani oblik fulerenol. Naime, fulereni su treća alotropska modifikacija ugljika, a zbog svojih specifičnih svojstava se primjenjuju u raznim granama industrije zbog čega se i gomilaju u okolišu gdje prolaze procese transformacija i biotransformacija do hidroksiliranog oblika fulerenola.

Zadatak rada bio je provesti istraživanje o utjecaju nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na rast, broj spora i sekundarni metabolizam plijesni *A. flavus* tijekom uzgoja uz izloženost VIS svjetlu u režimu koji simulira prirodnu izmjenu dana i noći, kao i odrediti utjecaj na vrstu i koncentracije produciranih sekundarnih metabolita.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus široko je rasprostranjena plijesan, a pripada skupini od 250 plijesni koje se ubrajaju u rod *Aspergillus*. Pripadnici ovog roda ime su dobili po karakterističnim strukturama koje sadrže nespolne spore, a uočio ih je talijanski botaničar i svećenik prilikom promatranja plijesni pod mikroskopom. Sam oblik spomenutih struktura asociirao ga je na škropilicu za raspršivanje svete vode koja se koristi pri raznim obredima rimokatoličke crkve što je rezultiralo nazivom "*Aspergillus*" (Hedayati i sur., 2007; Klich, 2007).

Radi efektivne moći raspršivanja spora zrakom, uz raspoloživost hranjivih tvari, ova plijesan zastupljena je gotovo svugdje. Najčešće je prisutna u tlu (osobito tropskih i suptropskih područja), stočnoj hrani, truloj vegetaciji, uskladištenim sjemenkama i žitaricama, ali i u ostalim vrstama prehrambenih proizvoda. Raste u pojasu iznad 25° sjeverne i 25° južne geografske širine (Klich, 2007).

Iznimno značajna karakteristika plijesni roda *Aspergillus* jest mogućnost produkcije sekundarnih metabolita male molekulske mase koji su toksični pri niskim koncentracijama, a nazivaju se mikotoksini (Kovač i sur., 2018a). Naime, producenti navedenih toksičnih metabolita kategorizirani su u tri sekcije roda *Aspergillus* (**Tablica 1.**): *Flavi*, *Nidulantes* i *Ochraceorosei*. U sekciju *Flavi* ubrajaju se: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii* i *A. togoensis* (Varga i sur., 2009; Varga i sur., 2011). Od svih navedenih, *A. flavus* je najvažniji producent mikotoksina, od kojih aflatoksini predstavljaju značajan problem kako za zdravlje ljudi, tako i za zdravlje životinja, ali i za cijelu ekonomiju i gospodarstvo (Kovač i sur., 2018a).

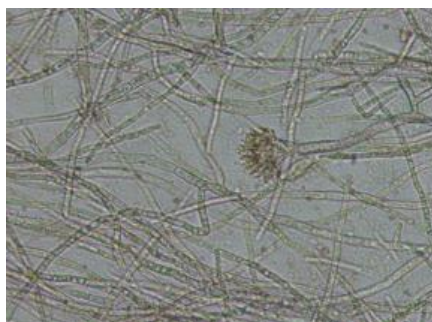
Plijesni roda *Aspergillus* mogu uzrokovati razne bolesti na klipu kukuruza, pamuku te sjemenkama kikirikija. Također, plijesni ovog roda imaju bitnu ulogu u biodegradaciji jer kao saprofitni mikroorganizam na biljnim i životinjskim ostacima živi u obliku micelija (Amaike i Keller, 2011; Hedayati i sur., 2007; Klich, 2007).

Tablica 1. Taksonomija plijesni roda *Aspergillus flavus* Link.
(Klich, 2007)

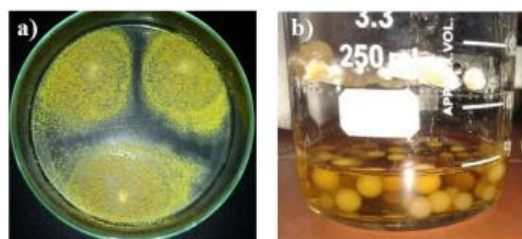
CARSTVO	GLJIVE (Fungi)
KOLJENO	ASCOMYCOTA
RAZRED	EUROTIOMYCETES/ASCOMYCETES
RED	EUROTIALES
PORODICA	TRICHOCOMACEAE
ROD	ASPERILLUS
VRSTA	FLAVUS

2.1.1. Građa stanica *A.flavus*

Postoje tri oblika u kojima se plijesan *A.flavus* može pronaći u okolišu, a o kojem se obliku radi ovisi o uvjetima okoline. Najčešći oblik prikazan je na **Slici 1.**, a radi se o miceliju - gustoj tvorevini umreženih hifa (cjevaste stanice promjera oko 2 μm do 5 μm te dužine oko 5 μm do 50 μm) koje formiraju pahuljastu ili paučinastu te prašnjavu prevlaku po čvrstoj podlozi, a u uvjetima submerznog uzgoja sačinjavaju okruglastu nakupinu, tj. pelet (**Slika 2.**), (Duraković, Duraković, 2003; Kovač, 2017).



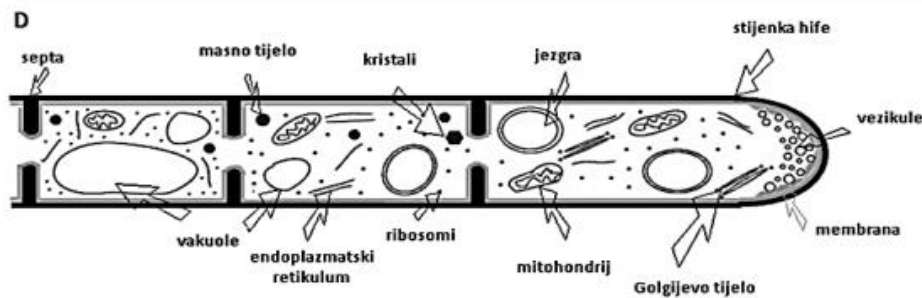
Slika 1. Micelij plijesni *A. flavus* NRRL 3251 pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400 x (Kovač, 2017)



Slika 2. Plijesan *A.flavus* uzgojena na čvrstoj podlozi (a) i u tekućoj podlozi (b)
(Kovač, 2017)

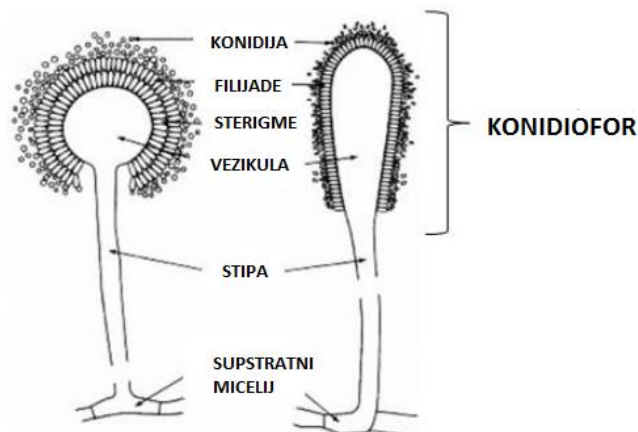
Hife mogu biti pregrađene tzv. septama što za rezultat ima podijeljenost hifa na dijelove, tj. septume. Pregrade, odnosno septe, ne dijele hifu u cijelosti na zasebne stanične dijelove

nego imaju otvore koji pružaju sposobnost strujanja citoplazme i organela (**Slika 3.**) (Kovač, 2017).



Slika 3. Građa septirane hife (Kovač, 2017)

Znatan broj hifa je vegetativan i one modeliraju tijelo plijesni. Suprotno tome, posebne zračne hife (konidiofori) nose komponente za razmnožavanje - konidiospore te sudjeluju u formiranju paučinastog izgleda kolonije plijesni (Bennett, 2010; Free, 2013; Klich, 2007). Površina im je hrapava, a sastoje se od stipe (izdužena drška) te vezikule (proširenje na kraju stipe). Vezikula sadržava mnoštvo sponosnih stanica (fijalide ili sekundarne sterigme) čijim dijeljenjem nastaju nespolne spore - konidiospore ili konidije (**Slika 4.**) (Klich, 2007).



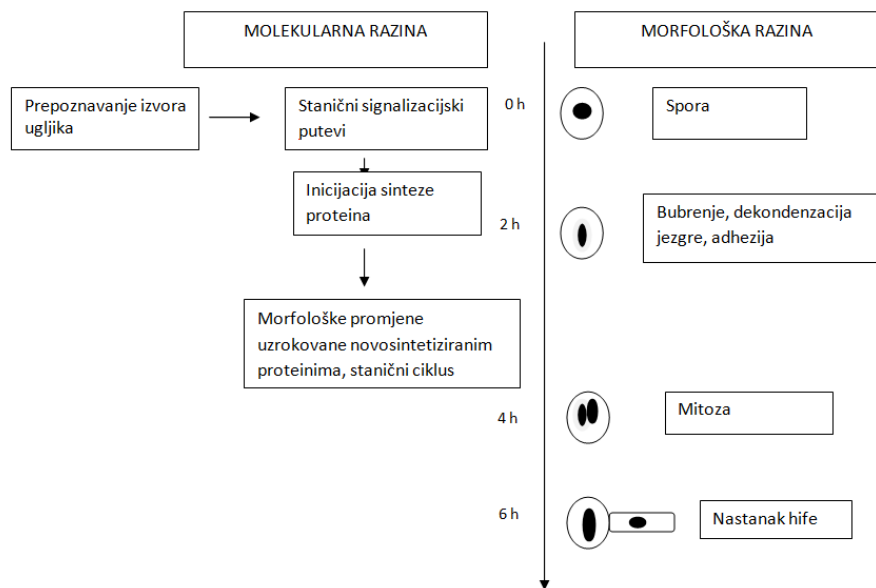
Slika 4. Građa konidiofora plijesni roda *Aspergillus* koja nosi spore
(prilagođeno iz Klich, 2007)

Ukoliko okolišni uvjeti nisu povoljni (npr. suša), *A. flavus* je u obliku sklerocija i spora. Sklerocij predstavlja gusto posložen micelij oko kojeg se nalazi sloj diferenciranih stanica i čvrsta ovojnica. Plijesan u obliku sklerocija može dugo postojati, a kad dođe do promjene

okolišnih faktora, on klija što dovodi do nastavljanja rasta, razvoja i razmnožavanja plijesni (Amaike i Keller, 2011; Heydati i sur., 2007; Klich, 2007).

2.1.2. Životni ciklus *A.flavus*

Ukoliko je zajamčena dostupnost hranjivih tvari, a vanjski čimbenici povoljni, doći će do klijanja spora ili sklerocija čime otpočinje životni ciklus plijesni *A.flavus* (Slika 5.). Kako bi do navedenog procesa došlo, optimalna temperatura kreće se od 10 - 48,8 °C, aktivitet vode 0,73 - 0,99, a pH vrijednost medija od 3,4 do 10 (Batillani i sur., 2012; Lakkireddy i sur., 2014). Slijedi bubrenje i hidratacija proklijale spore. U međuvremenu se aktiviraju mnogi signalni putevi (npr. Ras/MAP i cAMP/PKA) što vodi k integriranju spora i vezanju na supstrat. Odvija se mitozna te započinje rast hifa (Osherov i May, 2000; 2001). Slijedi stvaranje razgranatog micelija koji kroz određeni vremenski period stvara nove spore. U iznimnim slučajevima klijanja sklerocija može nastati micelij koji nema mogućnost formiranja spora (Coley-Smith i Cook, 1971; Duraković i Duraković, 2000; Heydati, 2007; Horn, 2007; Klich, 2007).

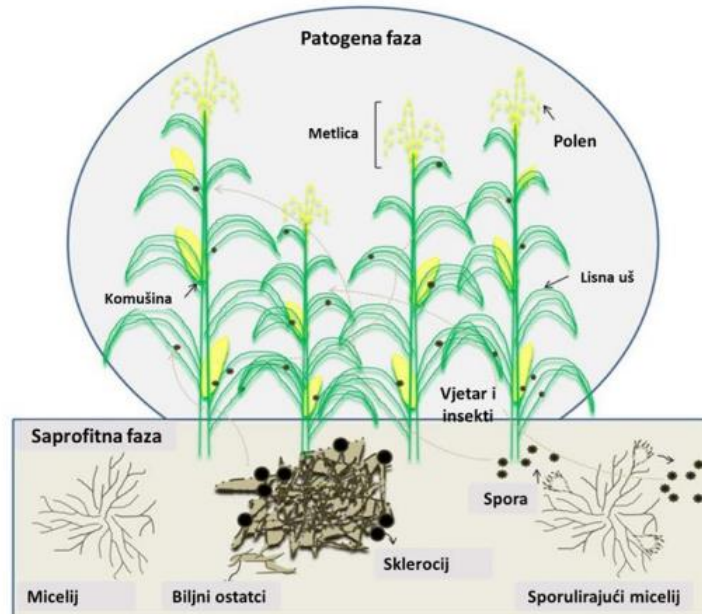


Slika 5. Pretpostavljeni model klijanja spora

(prilagođeno iz Osherov i May, 2000)

Kako je i prikazano na **Slici 6.**, životni ciklus ove plijesni podijeljen je na dvije faze. Prva, saprofitna faza, uključuje kolonizaciju biljnih ostataka u tlu. Druga (patogena) faza

podrazumijeva infekciju biljnog tkiva iznad površine tla (Batillani i sur., 2012; Lakkireddy i sur., 2014).



Slika 6. Životni ciklus plijesni *Aspergillus flavus* na kukuruзу – saprofitna i patogena faza (Kovač i sur., 2017. - prilagođeno iz Lakkireddy i sur., 2014)

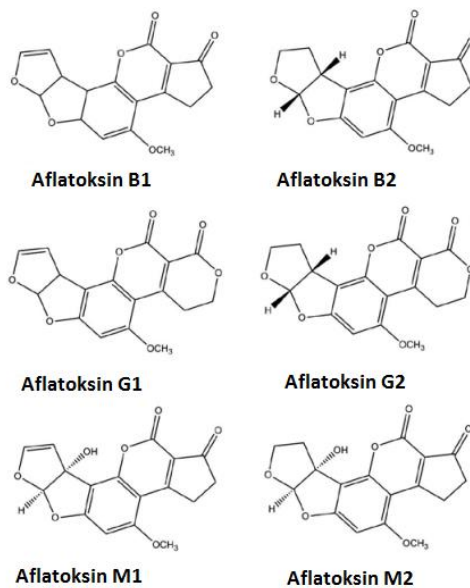
Novostvoreni micelij sintetizira brojne spore koje bivaju otpuštene u zrak, a dalje se prenose posredovanjem kukaca ili vjetra. Na taj način dolazi do infekcije usjeva. Stupanj infekcije usjeva ovisi o osjetljivosti biljke na infekciju, njenom zdravstvenom stanju, količini spora na polju te razini oštećenja usjeva kukcima (Battilani i sur., 2012).

2.2. Aflatoksini - svojstva i biosinteza

Određeni mikroorganizmi imaju sposobnost sinteze spojeva koji ne utječu na njihov rast i razvoj. Tako nastali spojevi nazivaju se sekundarni metaboliti (idioliti) (Šušković, 2014). Najpoznatija skupina toksičnih sekundarnih metabolita plijesni roda *Aspergillus* se naziva aflatoksini (Yu, 2012).

Aflatoksini (AF) su prvi put spomenuti ranih 60-ih godina prošlog stoljeća zbog velikog pomora pura u Engleskoj. Naime, životinje su bile hranjene brašnom kikirikija koje je bilo zaraženo aflatoksinima. Bolest je tada nazvana "Bolest X", a znanstvenici su zbog ugroženog zdravlja životinja i ljudi te velikih ekonomskih gubitaka ostali zaintrigirani te krenuli u razna istraživanja o toksičnoj supstanci (Chanda i sur., 2009; 2010).

Predstavnici skupine aflatoksina su aflatoksini B1, B2, G1, G2, M1 i M2, a njihove kemijske strukture prikazane su na **Slici 7**. Oznake B i G predstavljaju boju kojom aflatoksini fluoresciraju pri specifičnoj valnoj duljini (G - eng. *green* - zelena boja; B - eng. *blue* - plava boja), a slovom M označava se supstrat iz kojeg su izolirani (M - eng. *milk* - mlijeko) (Šarkanj i sur., 2010). AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 produkti su sekundarnog metabolizma plijesni dok su AF skupine M rezultat metabolizma sisavaca koji su izlučeni mlijekom nakon unosa hrane onečišćene aflatoksinima (Varga i sur., 2009).



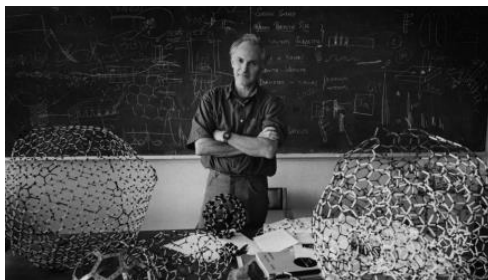
Slika 7. Kemijske strukture glavnih predstavnika aflatoksina
(Delaš, 2010)

Sam proces biosinteze aflatoksina sastoji se od tri faze. Prva faza inicirana je formiranjem norsolorinske kiseline (NOR) koja je temeljna struktura aflatoksina te ujedno i prvi stabilni metabolit. Biosinteza započinje u peroksisomima gdje uz katalitičko djelovanje enzimskog kompleksa NOR sintaza iz acetil-CoA i malonil-CoA nastaje NOR. Određeni dio acetil-CoA nastaje u peroksisomima β -oksidacijom dugolančanih masnih kiselina, dok se ostatak stvara u mitohondrijima putem β -oksidacije kratkolančanih masnih kiselina (Cleveland i sur., 2009; Reverberi i sur., 2012; Yabe i Nakajima, 2004). Tako nastala NOR pupanjem vezikule iz peroksisoma skuplja se u endosome te se stapa s endosomima iz endoplazmatskog retikuluma, vakuola i mitohondrija stvarajući aflatoksisome u kojima se zbivaju druge reakcije sinteze aflatoksina (Chanda i sur., 2009; Keller, 2015; Kistler i Broz, 2015).

Zatim se NOR, posredovanjem NOR reduktaze prevodi u averantin (AVN). AVN podliježe reakciji hidroksilacije u 5'-hidroksiaverantin (HAVN), a reakciju katalizira enzim P450 dehidrogenaza. Enzimskom aktivnošću 5'-hidroksiaverantinreduktaze HAVN prelazi u oksoaveratin (OAVN) zbog oksidacije 5'-hidroksilne skupine. Daljnji tijek reakcija ostvaruje se kroz dva načina. Iz OAVN može nastati averufanin (AVNN) ili averufin (AVN). AVNN dobije se dehidratacijom OAVN dok djelovanjem OAVN ciklaze dolazi do pretvorbe OAVN u AVF. Slijedi reakcija u kojoj se pomoću averufin monooksigenaze AVF prevodi u versikonal hemiacetal acetat (VHA). Nadalje, VHA se aktivnošću esteraze prevodi u versikonol (VOH), versikonol acetat (VOAc) i versikoloron (VONE). Nestabilni VOH se spontanom dehidratacijom pretvara u versikolorin C (VERC). Djelovanjem enzima versikonal ciklaza sintaze VER se prevodi u versikolorin B (VERB) koji je međuprodukt za biosintezu aflatoksina B₂ i G₂ čime završava druga faza biosinteze aflatoksina. Intermedijer za biosintezu AFB₁ i AFG₁ dobiva se dehidrogenacijom VERB u VERA, a provodi se posredstvom enzima desaturaze. Nadalje, VERA i VERB se djelovanjem kompleksa demetilsterigmatocistin sintaze konvertiraju u dimetilsterigmatocistin (DMST) i dihidrodimetilsterigmatocistin (DHDMST). Slobodne hidroksilne skupine DMST i DHDMST podliježu metilaciji uz enzim O-metiltransferazu I i II čime se formiraju sterigmatocistin (ST) i dihidrosterigmatocistin (DHST), tj. O-metilsterigmatocistin (OMST) i dihidro-O-metilsterigmatocistin (DHOMST) (Cleveland i sur., 2009; Yabe i Nakajima, 2004). Posljednji korak biosinteze AF podrazumijeva pretvorbu OMST u AF G₁ i B₁ te DHOMST u AF B₂ i G₂. U ovom koraku sudjeluju oksidoreduktaza, P450 monooksigenaza i NADH oksidaza (Cleveland i sur., 2009; Yabe i Nakajima, 2004). Nastali aflatoksini se egzocitozom otpuštaju iz stanica plijesni (Chanda i sur., 2009; 2010).

2.3. Fulereni

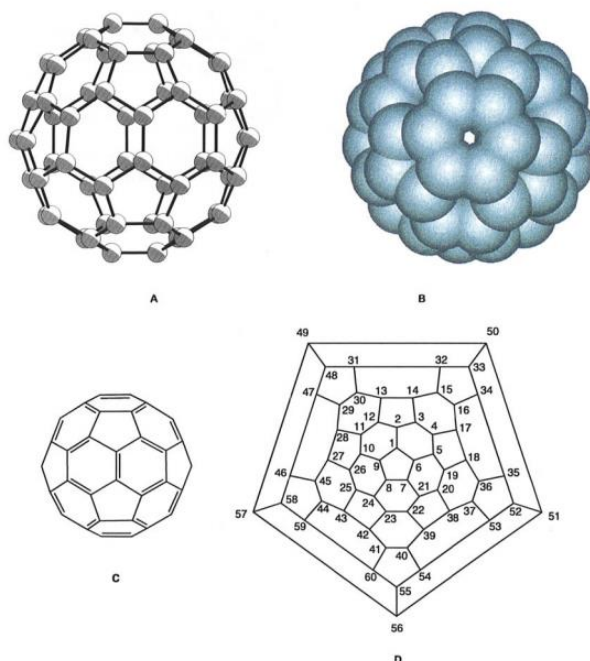
Fulereni su, uz grafit i dijamant, treća alotropska modifikacija ugljika. Naime, radi se o šupljim, zatvorenim sferičnim kavezima čistog ugljika s različitim brojem ugljikovih atoma (C₂₀, C₆₀, C₈₀, C₉₀). Ovi ugljikovi spojevi otkriveni su tijekom 70-ih godina prošlog stoljeća za što su zaslužni Harold W. Kroto (**Slika 8.**), Robert F. Curl i Richard E. Smalley koji su za svoje znanstveno postignuće nagrađeni Nobelovom nagradom.



Slika 8. Harold W. Kroto
(WEB 1)

2.3.1. Struktura fulerena C₆₀

Za oblik fulerena C₆₀ koji podsjeća na nogometnu loptu zaslužni su ugljikovi atomi (**Slika 9.**). Točnije, 60 sp² hibridiziranih ugljikovih atoma razmješteni su tako da čine mrežu sačinjenu od 20 šesteročanih i 12 peteročanih prstena. Promjer strukture iznosi 0,7 nm. Bitno je naglasiti kako peteročani prsteni ne dijele rubove. Svaki se ugljikov atom veže sa tri okolna ugljikova atoma. Naime, u peteročanim prstenima zastupljene su sve jednostruke veze, dok se u šesteročanim izmjenjuju jednostruke i dvostruke veze. Zahvaljujući dvostrukim vezama evidentna je delokalizacija π elektrona što je u direktnoj vezi sa zakrivljenošću molekule (Barky i sur., 2007; Talbot, 1999; Trpković i sur., 2012;).



Slika 9. Shematski prikaz C₆₀ a) pomoću kugli i štapića , b) model popunjavanja prostora, c) struktura sprijeda te d) Schlegelov dijagram s numeriranjem C-atoma
(Hirsch, 1994)

2.3.2. Zastupljenost fulerena C₆₀ u okolišu i primjena

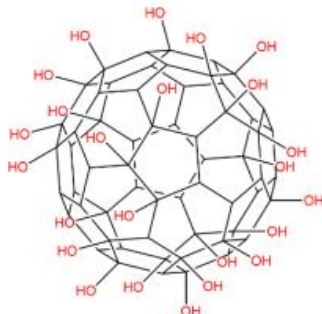
Osim što se u okolišu pojavljuje kao posljedica industrijalizacije, fuleren C₆₀ može biti prisutan kao popratna pojava raznih prirodnih procesa. Fulereni su zapaženi na mjestima udara groma, kraterima meteorita te u određenim vrstama stijena kao što su fulgurit i šungit. Isto tako, moguće ih je detektirati u mjestima zahvaćenim požarom zbog nepotpunog izgaranja organskih tvari ili u motorima s unutarnjim izgaranjem (Talbot, 1999). Nanočestice fulerena (nC₆₀) moguće je pronaći i u tlu, sedimentima rijeka, otpadnim i površinskim vodama te atmosferi. Nanočestice fulerena C₆₀ u okolišu uz prisutnost sunčevog svjetla podliježu oksidaciji čime nastaju njihovi epoksi i hidroksi derivati. Nadalje, dio derivata prelazi u fulerenole koji sadrže 20-24 hidroksilne skupine. Pretpostavlja se kako su fulerenoli podložni kemijskim transformacijama u nazočnosti svjetla što rezultira mineralizacijom fulerenola u topljivi anorganski i organski ugljik. Epoksi i hidroksi derivati mogu nastati i kemijskim promjenama uz prisutnost ozona (Kovač, 2017).

Kao što je već navedeno, zbog prisutnosti dvostrukih veza dolazi do delokalizacije π elektrona pa fuleren C₆₀ posjeduje zakrivljenu strukturu. Osim toga, zakrivljena struktura pruža širok spektar karakterističnih svojstava (hidrofobnost, fotoosjetljivost, antioksidativna aktivnost) čime je omogućena njegova raznolika i sadržajna uporaba u mnoštvu industrija. Naime, isti se koristi za pripremu pripravaka za njegu kose, šminke te raznih drugih kozmetičkih proizvoda. Izuzev kozmetičke industrije, fuleren C₆₀ svoje mjesto pronašao je u proizvodnji raznih materijala, solarnih ćelija, kablova, tintnih materijala i drugo (Mihalitsch i Huebner, 2008).

2.3.3. Fulerenol C₆₀(OH)₂₄

Fulerenol C₆₀(OH)₂₄ (FNP) jest spoj topljiv u vodi čija svojstva nisu dovoljno razjašnjena što ga čini predmetom raznih studija. Naime, postoji nekoliko istraživanja o toksičnosti FNP-a općenito. Što se tiče mikotoksikogenih plijesni, ona još uvijek nije izvršena (Kovač i sur., 2018b). Naime, Vávrová i sur. (2012) smatraju kako su fulerenoli tvari slabo toksičnih svojstava, a Çavaş i sur. (2014) navode da ko-izloženost fulerenolu bitno snižava citotoksičnost te genotoksičnost acetamiprida u stanicama IMR-90. Zahvaljujući antioksidativnom djelovanju i mogućnosti neutralizacije reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS) objavljene su pretpostavke o antiproliferativnim (antitumorskim) svojstvima fulerenola (MilicTorres i sur., 2010.) te o sposobnosti zaštite ljudske membrane eritrocita od

visokoenergetskih elektrona (Grebowski i sur., 2018). Stoga isti može imati primjenu kao biokemijsko sredstvo prilikom kemoterapije te u području radijacijske biologije (Kovač i sur., 2018b).



Slika 10. Molekula fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$
(Kovač, 2017)

2.3.4. Antimikrobni učinak nanočestica fulerena C_{60} i fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$

Raznim istraživanjima dokazano je kako nC_{60} i FNP imaju mnoštvo utjecaja na rast prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama. Naime, osim pospješivanja navedenog procesa, može doći i do inhibiranja istog (Aoshima i sur., 2009; Fortner i sur., 2005; Gao i sur., 2011; Hadduck i sur., 2010; Huang i sur., 2014; Lyon i sur., 2006; Unković i sur., 2015).

Antimikrobni, odnosno toksični utjecaj ovih nanočestica ovisan je o:

- načinu pripreme suspenzije nanočestica,
- veličini nanočestica,
- primijenjenoj koncentraciji,
- vrsti i karakteristikama analiziranog organizma te
- principu i kriterijima uzgoja.

Prilikom određivanja toksičnog djelovanja nanočestica fulerena na mikroorganizme bitno je znati kako je fuleren C_{60} hidrofobna molekula dobro topljiva u benzenu, naftalenima te alkenima, a slabo topljiva u vodi (10^{-9} $\mu\text{g}/\text{mL}$) kako bi se odabrala adekvatna metoda pripreme nanočestica za daljnja ispitivanja (Fortner i sur., 2006; Lyon i sur., 2006; Marković i Trajković, 2008). Pretežno, metode priređivanja nanočestica uključuju:

- pripremu nanočestica uz izmjenu organskog otapala,
- pripremu nanočestica dugotrajnim miješanjem u vodi te

- enkapsulaciju fulerena polivinilpirilidonom (Fortner i sur., 2005; Hadduck i sur., 2010; Lyon i sur., 2006; Marković i sur., 2007).

Antimikrobni učinak nanočestica fulerena i fulerenola pripisuje se:

- međudjelovanju sa staničnom membranom,
- koncentriranju nanočestica unutar stanica te pohranjivanjem u organelima,
- oksidativnom djelovanju u tami ili uz djelovanje laserskih zraka (fotoekscitaciju) (Baddireddy i sur., 2007; Chen i sur., 2010; Grebowski i sur., 2013; Marković i Trajković, 2008; Monticelli i sur., 2009; Quiao, 2007; Yamakoshi i sur., 2003).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je provesti istraživanje o utjecaju nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na rast, broj spora i sekundarni metabolizam plijesni *A. flavus* tijekom uzgoja uz izloženost VIS svjetlu u tekućoj podlozi kao i odrediti utjecaj na vrstu i koncentracije produciranih sekundarnih metabolita.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

Ekstrakt kvasca, saharoza te krumpirov glukozni agar (eng. *Potato Dextrose Agar*, PDA) nabavljeni su iz Italije, od tvrtke Biolife. Standard mješavine aflatoksina (B1, G1, B2, G2) dobavljen je iz Biopure u Austriji, dok su acetonitril i metanol dobiveni od tvrtke Merck (Njemačka). Od tvrtke Sigma Aldrich (Austrija) dobavljeni su amonijev acetat te ledena octena kiselina. Standardi metabolita plijesni *A. flavus* pribavljeni su od Axxora Europe (Švicarska), LGC Promochen GmbH (Njemačka), Iris Biotech GmbH (Njemačka), Romer Labs Inc. (Austrija) te Sigma Aldrich (Austrija).

3.2.2. Sinteza fulerenola, priprava i karakterizacija suspenzije nanočestica

Fulerenol je sintetiziran postupkom prema Mirkovu i sur. (2004), a suspenzija nanočestica je pripravljena u ultračistoj vodi u koncentraciji 10 mg/mL. Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering*, DLS) određena je veličina nanočestica u pripravljenoj suspenziji, dok je za određivanje naboja nanočestica (zeta potencijala; ζ) primjenjena metoda elektroforetskog rasipanja svjetlosti (eng. *Electrophoretic Light Scattering*, ELS) (Kovač i sur.; 2018a). Mjerenja su provedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., UK).

3.2.3. Rast plijesni te određivanje broja spora

Plijesan *Aspergillus flavus* NRRL 3251, iz zbirke plijesni Katedre za biokemiju i toksikologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek uzgojena je u tekućoj podlozi s kvašćevim ekstraktom i saharozom (eng. *Yeast Extract Sucrose*, YES) prema dostupnom protokolu (Kovač i sur.; 2017). Inkubacija je provedena pri 29 °C, tijekom 168 sati na orbitalnoj tresilici (IKA, KS 260, Njemačka) podešenoj na 200 o/min uz prisutnost VIS svjetla (LED svjetlo, 50 W, 2250 Lux, Stella) u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama i prisutnost 0, 10, 100 i 1000 ng/mL

nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (FNP). Svaka 24 sata od početka inkubacije izuzimani su uzorci podloge i poraslog micelija te odvajani filtracijom, a korišteni su za određivanje koncentracije produciranih sekundarnih metabolita. Do trenutka pripreme uzoraka čuvani su na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prethodno je $500\text{ }\mu\text{L}$ podloge odvojeno za određivanje utjecaja FNP na broj spora plijesni prema ranije objavljenom protokolu (Kovač i sur., 2018a).

3.2.4. Određivanje koncentracije sekundarnih metabolita plijesni *A.flavus*

Koncentracija sekundarnih metabolita plijesni *A. flavus*, aflatoksina i njihovih prekursora u podlozi determinirana je pomoću LC-MS/MS metode (tekućinska kromatografija u sprezi s tandemskom masenom spektrometrijom) primjenom tzv. „razrijedi i mjeri“ tehnike.

Podloga uskladištena pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je u staklenim vialama razrijeđena (1:9, v/v) smjesom ekstrakcijskog otapala i otapala za razrjeđivanje (1:1, v/v) te su tako pripremljeni uzorci podvrgnuti analizi prema Sulyok i sur. (2020). Prethodno uskladišteni micelij pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je povrnut dezintegraciji na kugličnom mlinu Omni® Bead Ruptor 12 po protokolu Kovača i sur. (2019). Ekstrakcijska smjesa u epruветama za homogenizaciju volumena 2 mL se sastojala od 100 mg micelija, 1 g staklenih kuglica promjera 0,5 mm ispranih kiselinom i prethodno ohlađenih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ te 1 mL ekstrakcijskog otapala po Sulyoku i sur. (2020). Homogenizacija je provedena pri brzini od 5 m/s tijekom 120 s, u 6 ciklusa od 20 s uz hlađenje uzoraka u ledenoj kupelji između svakog ciklusa. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani pri $15\ 000\times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 20 minuta (Thermo Scientific SL 8R (Thermo Scientific™, Finska). Ekstrakti su preneseni u vijale te podvrgnuti analizi u svrhu detekcije sekundarnih metabolita prema metodi Sulyoka i sur. (2020). Analiza je izvršena na QTRAP 5500 MS/MS sustavu (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) opremljenom sa TurboVionskim raspršivačem kao ionskim izvorom (ESI) i Agilent 1290 UHPLC sustavom (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Kromatografsko razdvajanje je provedeno na Gemini®C18-koloni (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) uz odgovarajuću zaštitnu pretkolonu (Sulyok i sur., 2020; Malachova i sur., 2014).

Za kvalitativnu i kvantitativnu obradu dobivenih podataka korišten programski paket Analyst 1.6.2, odnosno MultiQuant 3.0.3.

3.2.5. Obrada i prikaz rezultata

Za obradu i prikaz rezultata korišteni su programski paketi Microsoft Office 2016 te Statistica 13.1 (Dell Inc., Texas, USA).

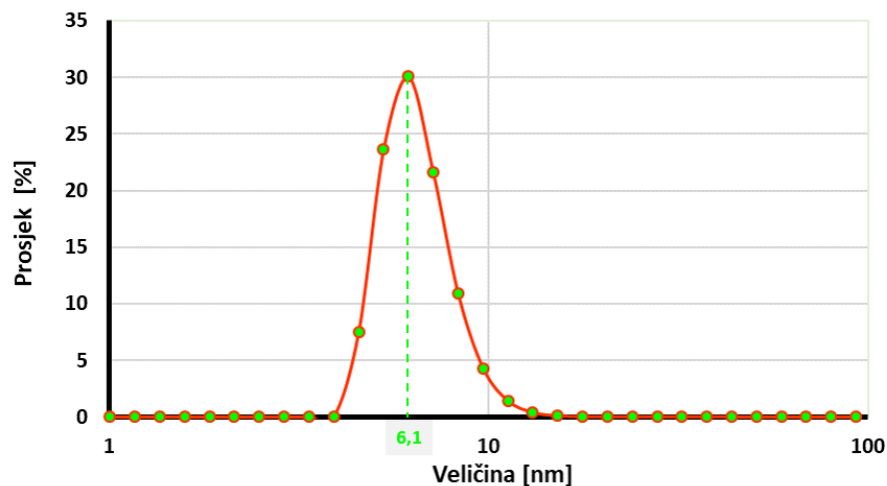
4.REZULTATI I RASPRAVA

Nanočestice fulerenola se očekuju u okolišu kao rezultat transformacija i biotransformacija nanočestica fulerena. Međutim, njihov utjecaj na mikotoksikogene plijesni tijekom interakcije u okolišu još uvijek nije dovoljno istražen. Stoga je zadatak ovog rada bio provesti istraživanje o utjecaju nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na rast, broj spora i sekundarni metabolizam plijesni *A. flavus* tijekom uzgoja uz izloženost VIS svjetlu u tekućoj podlozi kao i odrediti utjecaj na vrstu i koncentracije produciranih sekundarnih metabolita.

4.1. Karakterizacija suspenzije nanočestica fulerenola

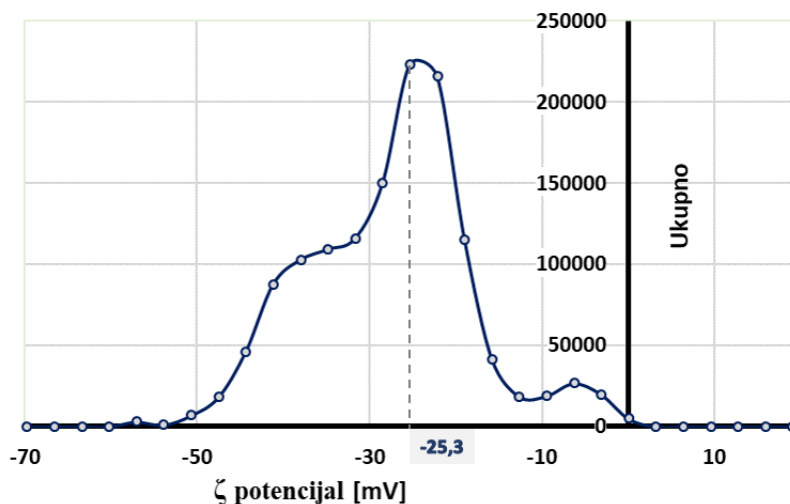
Karakterizacija nanočestica provedena je u svrhu utvrđivanja odgovaraju li čestice u pripremljenoj suspenziji kriterijima definiranim od strane Zajedničkog istraživačkog centra Europske komisije. Naime, nanočesticama se smatraju prirodne, slučajno ili namjerno proizvedene čestice koje imaju vanjski promjer između 1 i 100 nm (pojedinačno, kao agregati ili aglomerati), a najmanje 50 % od ukupnog broja čestica (Rauscher i sur., 2015.).

Određivanje prosječne veličine FNP provedeno je primjenom metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) (Slika 11.). Rezultati pokazuju kako je u pripremljenoj suspenziji FNP srednja vrijednost hidrodinamičkog promjera nanočestica 6,1 nm.



Slika 11. Karakterizacija nanočestica fulerenola – prosječni hidrodinamički promjer

Nadalje, metodom elektroforetskog rasipanja svjetlosti (ELS) određena je i vrijednost zeta potencijala pripremljene suspenzije nanočestica, a iznosi -25,3 mV (Slika 12.).



Slika 12. Karakterizacija nanočestica fulerenola – zeta (ζ) potencijal

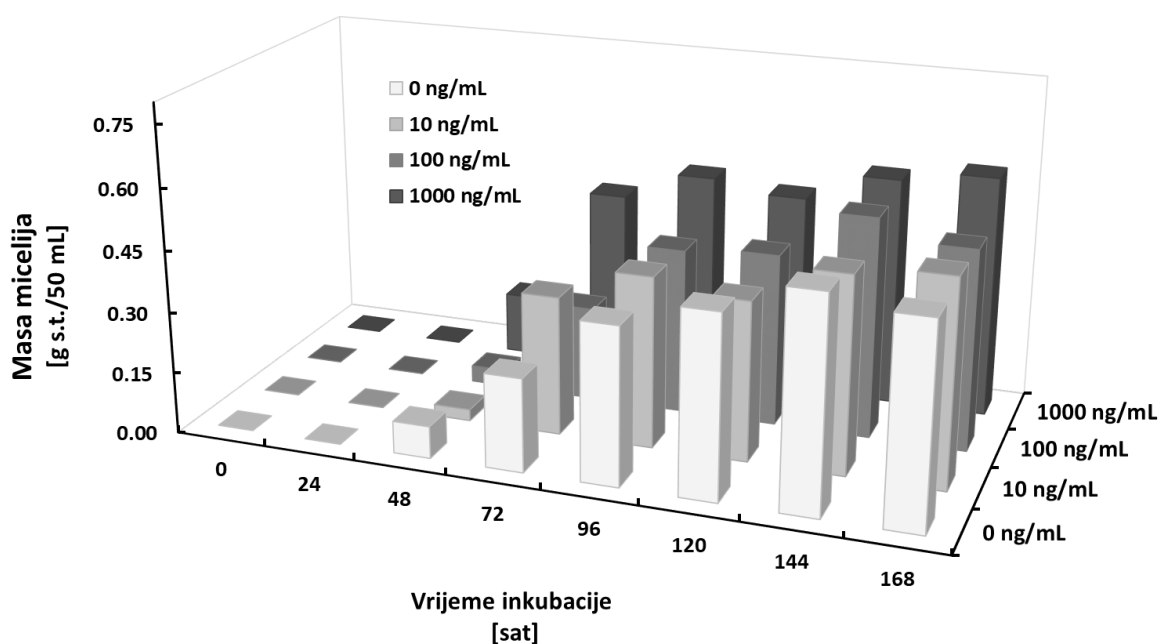
Kao što je vidljivo iz rezultata (**Slika 11., 12.**), približne vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala nanočestica fulerenola odgovaraju literaturnim vrijednostima. Unković i sur. (2015) su odredili prosječni hidrodinamički promjer od 8,7 nm, a što je u skladu i s rezultatima Kovača i sur. (2017.; 2018a; 2018b; 2020a; 2020b). Također, i ζ potencijal okarakterizirane suspenzije je u skladu s literaturnim navodima (Kovač i sur., 2017.; 2018a; 2018b; 2020a; 2020b; Ratnikov i sur., 2011; Unković i sur., 2015).

4.2. Utjecaj nanočestica fulerenola na rast plijesni *A. flavus*

Tijekom 168 sati inkubacije praćen je utjecaj FNP na rast micelija plijesni *A. flavus* NRRL 3251 pri 29 °C, uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati VIS svjetlo/12 sati tama (**Slika 13.**). Masa micelija određivana je u vremenskom intervalu od 24 do 168 sati uzgoja svaka 24 sata, dok nakon prva 24 sata uzgoja nije bilo dovoljno poraslog micelija da bi se njegova masa mogla odrediti.

Nadalje, iz **Slike 13.** je vidljivo da pri svim ispitivanim koncentracijama FNP (10, 100 i 1000 ng/mL) masa poraslog micelija nije značajno različita u odnosu na kontrolni uzgoj. Međutim, može se zamijetiti da je najveći porast mase micelija vidljiv pri koncentraciji FNP od 1000 ng/mL. Takvi rezultati su slični onim koje su objavili Kovač i sur. (2018), ali su oni dobiveni uzgojem plijesni bez izloženosti VIS svjetlu. Također, Gao i sur. (2011) su pokazali kako FNP mogu imati stimulirajući učinak na porast micelija plijesni *A. niger*, što je djelomično u skladu

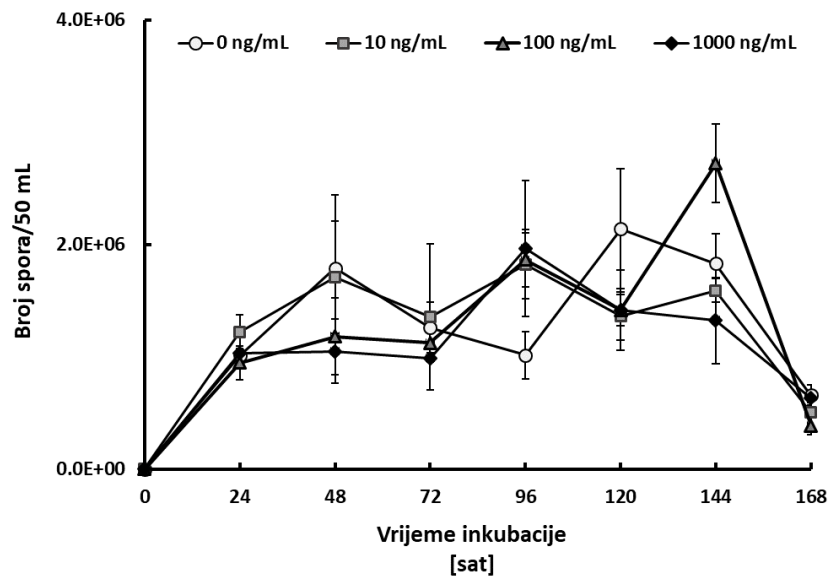
sa rezultatima prikazanim na **Slici 13.**, no radi se o većoj primijenjenoj koncentraciji FNP nego u slučaju ovog diplomskog rada. Suprotno tome, Unković i sur. (2015) su objavili kako FNP utječu na smanjenje biomase kod nekih plijesni pripadnika roda *Aspergillus*, a vjerojatno zbog uvjeta primijenjenih pri eksperimentalnom dijelu tog istraživanja rezultati se ne poklapaju sa prikazanim na **Slici 13.**



Slika 13. Utjecaj nanočestica fulerenola na rast micelija plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 pri 29 °C, tijekom 168 sati uzgoja uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama.

4.3. Utjecaj nanočestica fulerenola na broj spora plijesni *A. flavus* u podlozi za uzgoj

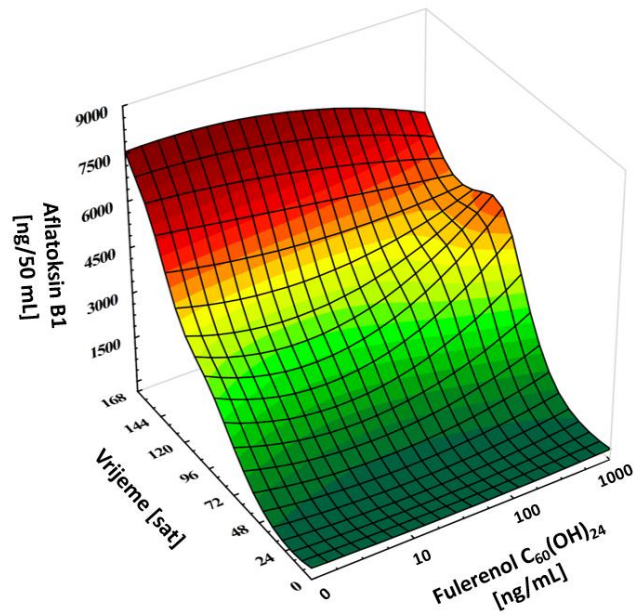
Na **Slici 14.** prikazan je utjecaj FNP na broj spora plijesni *A. flavus* NRRL 3251 u podlozi za uzgoj pri ranije opisanim uvjetima uzgoja. Promatra li se promjena broja spora plijesni pod utjecajem FNP vidljivo je da dolazi do promjena broja spora tijekom vremena inkubacije, no nije vidljiv utjecaj primijenjene koncentracije FNP na broj spora. Jednostavnije rečeno, nema razlike između primijenjenih koncentracija FNP, odnosno između pojedinih koncentracija FNP i kontrolnog uzgoja. Unatoč tome, u literaturi postoje dokazi o povezanosti oksidativnog stresa, kojeg FNP mogu modulirati, produkcije spora te biosinteze aflatoksina (Kovač i sur., 2017; 2018a; 2018b). Možda razina modulacije oksidativnog statusa plijesni s FNP pri primijenjenim uvjetima uzgoja nije dovoljna da se odrazi i na produkciju broja spora plijesni.



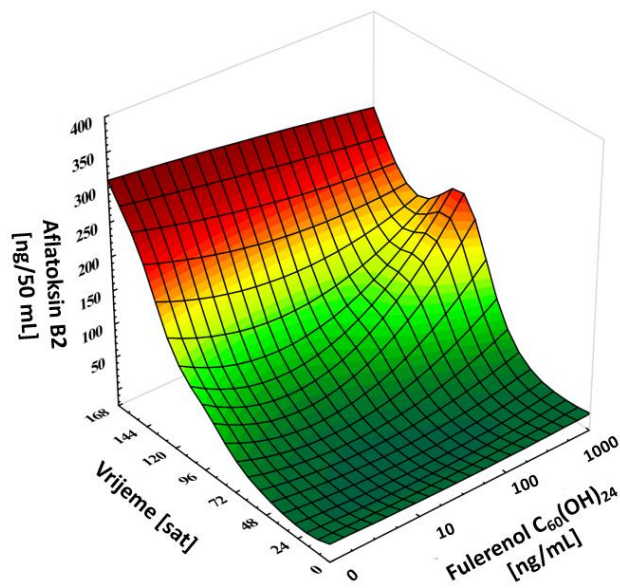
Slika 14. Utjecaj nanočestica fulerenola na broj spora plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u podlozi za uzgoj tijekom uzgoja pri 29 °C, u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm SEM tri neovisna uzgoja.

4.4. Utjecaj nanočestica fulerenola na sekundarni metabolizam plijesni *A. flavus*

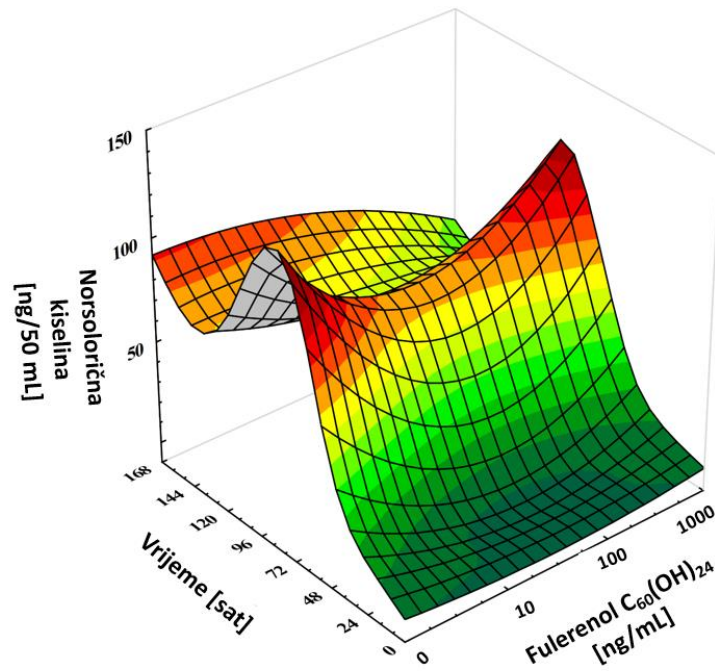
Na **Slici 15.** prikazan je utjecaj FNP na produkciju aflatoksina B1 pri ranije opisanim uvjetima uzgoja. Vidljivo je kako se vremenom inkubacije povećava ukupna koncentracija produciranog aflatoksina B1. Nadalje, vidljive su i razlike pri utjecaju pojedinih koncentracija FNP. Naime, povećanjem koncentracije FNP nakon 168 sati inkubacije dolazi do smanjenja ukupne koncentracije proizvedenog aflatoksina B1. Tako FNP u koncentraciji od 1000 ng/mL pokazuju najjače antiaflatoksikogeno djelovanje u odnosu na zabilježenu koncentraciju aflatoksina B1 kod kontrolnog uzgoja, ali i ostale dvije primijenjene koncentracije FNP od 10 i 100 ng/mL. Također, identičan trend je zabilježen i u slučaju produciranih koncentracija aflatoksina B2 (**Slika 16.**).



Slika 15. Utjecaj nanočestica fulerenola na produkciju aflatoksina B1 tijekom uzgoja plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u YES podlozi i miceliju plijesni u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svijetlo/12 sati tama.



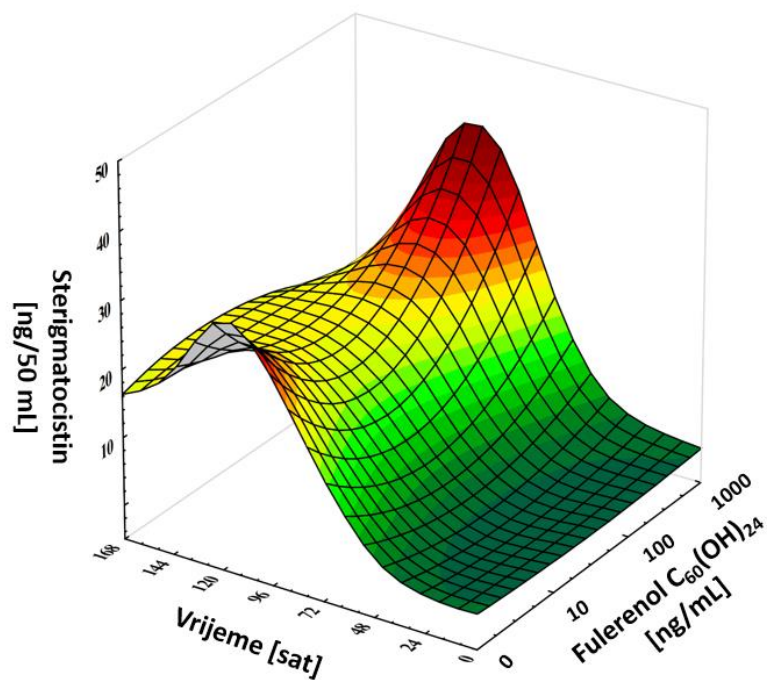
Slika 16. Utjecaj nanočestica fulerenola produkciju aflatoksina B2 tijekom uzgoja plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u YES podlozi u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svijetlo/12 sati tama.



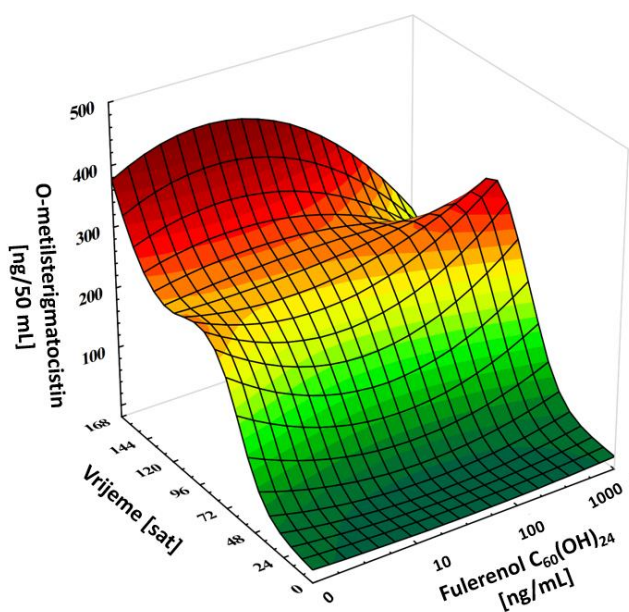
Slika 17. Utjecaj nanočestica fulerenola produkciju norsolorične kiseline tijekom uzgoja plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u YES podlozi u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svijetlo/12 sati tama.

Međutim, ukoliko se razmotre koncentracije produciranih prekursora aflatoksina (**Slika 17.-19.**) može se zaključiti da je utjecaj FNP vidljiv već na početku i tijekom puta biosinteze aflatoksina. Naime, u produciranim koncentracijama norsolorične kiseline (**Slika 17.**), sterigmatocistina (**Slika 18.**) i o-metilsterigmatocistina (**Slika 19.**) zapravo se po identičnom obrascu ogleda utjecaj FNP na aflatoksin B1 i B2.

Na temelju analize sekundarnog metabolizma plijesni *A. flavus* pod utjecajem nanočestica fulerenola uz uzgoj pod uvjetima koji simuliraju prirodnu izmjenu dana i noći vidljiv je utjecaj na samom početku puta biosinteze aflatoksina (**Slika 18.**), a kao takav se reflektira i na krajnje produkte puta (**Slika 16., 17.**). Na osnovu navedenog se čini da bi trebalo provesti daljnja istraživanja na molekularno-genetskoj razini kako bi se utvrdili stvarni razlozi ovakvog utjecaja FNP na plijesan.



Slika 18. Utjecaj nanočestica fulerenola produkciju sterigmatocistina tijekom uzgoja plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u YES podlozi u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama.



Slika 19. Utjecaj nanočestica fulerenola produkciju O-metilsterigmatocistina tijekom uzgoja plijesni *Aspergillus flavus* NRRL 3251 u YES podlozi u trajanju od 168 sati uz izloženost VIS svjetlu u režimu 12 sati svjetlo/12 sati tama.

5.ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata prikazanih u ovom diplomskom radu može se zaključiti:

1. Pripremljena suspenzija fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ u ultračistoj vodi dominantno je sadržavala čestice veličine 6,1 nm, dok je zabilježen naboj istih čestica od -25,3 mV.
2. Nanočestice fulerenola nisu značajno utjecale na rast plijesni, uz izuzetak koncentracije od 1000 ng/mL koja je uzrokovala određeno povećanje biomase.
3. Nije zabilježena razlika u broju spora plijesni pod utjecajem primijenjenih koncentracija FNP, odnosno između pojedinih koncentracija FNP i kontrolnog uzgoja.
4. Utjecaj FNP vidljiv je već na početku i tijekom puta biosinteze aflatoksina. U produciranim koncentracijama norsorolične kiseline, sterigmatocistina i o-metilsterigmatocistina se po identičnom obrascu ogleda utjecaj FNP na aflatoksin B1 i B2 iz kojeg je vidljiva ovisnost o koncentraciji FNP pri čemu 1000 ng/mL FNP izaziva antiaflatoksikogeni učinak.

6.LITERATURA

- Amaike S, Keller NP: *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology 49:107-133, 2011.
- 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.
- Badireddy AR, Hotze EM, Chellam S, Alvarez P, Wiesner MR: Inactivation of bacteriophages via photosensitization of fullerol nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 41:6627-6632, 2007.
- Bakry R, Vallant RM, Najam-ul-Haq M, Rainer M, Szabo Z, Huck CW, Bonn GK: Medicinal applications of fullerenes. *Internal Journal of Nanomedicine* 2:639-649, 2007.
- 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.
- Bennett, JW: An overview of the genus *Aspergillus*. U: *Aspergillus: molecular biology and genomics* (Machida, M., Gomi, K., ured) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 1-18., 2010.
- Çavaş T, Çinkiliç N, Vatan O, Yilmaz D: Effects of fullerene nanoparticles on acetaminophen induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 114:1-7, 2014.
- Chanda A., Roze LV, Linz JE: A possible role for exocytosis in aflatoxin export in *Aspergillus parasiticus*. *Eukaryot. Cell* 9:1724-1727, 2010.
- Chanda A, Roze LV, Kang S, Artymovich KA, Hicks GR, Raikhel NV, Calvo AM, Linz JE: A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 19533-19538, 2009.
- Chen R, Ratnikova TA, Stone MB, Lin S, Lard M, Huang G, Hudson JS, Ke PC: Differential uptake of carbon nanoparticles by plant and mammalian cells. *Small* 6:612-617, 2010.
- 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.
- Coley-Smith JR, Cook RC: Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9:65-92, 1971.
- Delaš F: Mikrobni toksini U: Hengl. B. (ed): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, str. 31-49. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska, 2010.
- Delaš F: Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, 31-39, Osijek 2010.
- Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.

- Duraković S, Duraković L: Specijalna mikrobiologija. 1. izd., Durieux, Zagreb, 2000.
- Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C: Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294:116–119, 2002.
- Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, ColvinVL, Huges JB: C60 in water: Nano crystal formation and microbial response. *Environmental Science & Technology* 39:4307-4316, 2005.
- Free, SJ: Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*: 81, 34-82, 2013.
- 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 life span in diverse biological models. *Plos One* 6:e19976, 2011.
- Grebowski J, Kaźmierska P, Litwinienko G, Lankoff A, Wolszczak M, Krokosz A: Fulleranol C₆₀(OH)₃₆ protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1860:1528-1536, 2018.
- Grebowski J, Krokosz A, Puchala M: Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1828:241-248, 2013.
- 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 SOCIETY* 153:1677-1692, 2007.
- Hirsch A: The chemistry of the fullerenes. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
- Horn, BW: Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: A review *Food additives contaminants* 24:1088-1101, 2007.
- Hotze EM, Labille J, Alvarez P, Weisner MR: Mechanisms of photo chemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water. *Environmental Science & Technology* 42:4175-4180, 2008.
- Huang F, Ge L, Zhang B, Wang Y, Tian H, Zhao L, He Y, Zhang X: A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria. *Chemosphere* 108: 411-417, 2014.
- Isaacson CW, Usenko CY, Tanguay RT, Field JA: Quantification of fullerenes by LC/ESI-MS and its application to in vivo toxicity assays. *Analytical Chemistry* 79:9091-9097, 2007.

- Isakovic A: Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicological Sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 91:173–183, 2006.
- Johnson-Lyles DN, Peifley K, Lockett S, Neun BW, Hansen M, Clogston J, Stern ST, McNeil SE: Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248:249-258, 2010.
- Kamat JP, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI, Mohan H, Mittal P: Oxidative damage induced by the fullerene C₆₀ on photosensitization in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions* 114:145-159, 1998.
- Kamat JP, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI, Mohan H: Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* 155:55-61, 2000.
- Käsermann F, Kempf C: Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene. *Antiviral Research* 34:65-70, 1997.
- Keller NP: Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nature Chemical Biology* 11:671-677, 2015.
- Kistler HC, Broz K: Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Frontiers in Microbiology* 6:1-11. 2015.
- Klich MA: *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8:713-722, 2007.
- Kong L, Zepp RG: Production and consumption of reactive oxygen species by fullerenes. *Environmental Toxicology & Chemistry* 31:136-143, 2012.
- Kovač T: Modulacija oksidativnog stresa plijesni *aspergillus flavus* nanočesticama fullerena. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2017.
- Kovač T, Šarkanj B, Klapac T, Borišev I, Kovač M, Nevistić A, Strelec I: Fullerol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles and mycotoxigenic fungi: a preliminary investigation into modulation of mycotoxin production. *Environmental Science and Pollution* 24:16673-16681, 2017.
- Kovač T, Borišev I, Crevar B, Čačić Kenjeric F, Kovač M, Strelec I, N Ezekiel C, Sulyok M, Krska R, Šarkanj B: Fullerol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles modulate aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. Article in *Scientific Reports* 8, 2018b
- Kovač T, Šarkanj B, Crevar B, Kovač M, Lončarić A, Strelec I, Ezekiel NC, Sulyok M, Krska R: *Aspergillus flavus* NRRL 3251 Growth, Oxidative Status, and Aflatoxins Production Ability In Vitro under Different Illumination Regimes. *Toxins* 10: 528, 2018a

- Kovač T, Šarkanj B, Borišev I, Djordjevic A, Jović D, Lončarić A, Babić J, Jozinović A, Krska A, Gangl J, N.Ezekiel C, Suylok M, Krska R: Fullerol C₆₀(OH)₂₄ Nanoparticles Affect Secondary Metabolite Profile of Important Foodborne Mycotoxigenic Fungi In Vitro. *Toxins* 12:231, 2020a.
- Kovač T, Borišev I, Kovač M, Lončarić A, Čačić Kenjerić F, Djordjevic A, Strelec I, Ezekiel NC., Suylok M, Krska R, Šarkanj B: Impact of fullerol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles on the production of emerging toxins by *Aspergillus flavus*. *Scientific Reports* 10:725, 2020b.
- Lakkireddy K, Kasturi K, Sambasiva Rao KRS: Aflatoxins in Food and Feed: The Science of Safe Food. *Research & Reviews: Journal of Food Science and Technology* 3:6-9, 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, Alvarez PJJ: Fullerene water suspension (nC₆₀) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation. *Environmental Science & Technology* 42:8127-8132, 2008a.
- 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, 2008b.
- Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R: Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A* 1362:145–156, 2014.
- Marković Z, Todorović-Marković B, Kleut D, Nikolić D, 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: Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 29:3561-3573, 2008.
- Mihalitsch R, Kallinger C, Verbrant Y, Veefkind V, Huebner SR: The fullerene patent landscape in Europe. *NANOTECHNOLOGY LAW & BUSINESS* 5:85-94, 2008.
- MilicTorres V, Posa M, Srdjenovic B, Simplício AL: Solubilization of fullerene C₆₀ in micellar solutions of different solubilizers. *Toxicol Mech Methods* 20:298-305, 2010.
- Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, Vojinovic-Miloradov MB, Kovacevic RZ: Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fulleranol, C₆₀(OH)₂₄. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 11:201–207, 2004.
- Monticelli L, Salonen E, Ke PC, Vattulainen I: Effects of carbon nanoparticles on lipid membranes: a molecular simulation perspective. *Soft Matter* 5:4433-4445, 2009.

- Oberdörster E: Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives* 112:1058-1062, 2004.
- Oshero N, May G: Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155:647-656, 2000.
- Qiao R: Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Letters* 7:614-619, 2007.
- Ratnikova TA, Govindan PN, Salonen E, Ke PC: *In vitro* polymerization of microtubules with fullerene derivative. *ACS Nano* 5:6306-6314, 2011.
- Rauscher H, Roebben G, Boix Sanfeliu A, Emons H, Gibson P, Koeber R, Lisinger T, Ramussen K, Riego Sintes J, Sokull-Kluettgen B, Stamm H: Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial", Part 3: Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation. EUR - Scientific and Technical Research Reports, Italija, 2015.
- 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.
- Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM., Ausman KD, Tao YJ, Shitaraman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL: The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters* 4:1881-1887, 2004.
- Sulyok M, Stadler D, Steiner D, Krska R: Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of >500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412:2607-2620, 2020.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Zagreb, 2010.
- Šušković J: Sekundarni metabolizam u mikroorganizama: biosinteza antibiotika, regulacija i funkcija. Predavanje iz kolegija "Fiziologija industrijskih mikroorganizama". Prehrambeno - biotehnoški fakultet u Zagrebu, Zagreb, 2014/15.
- Talbot C: Fullerene and nanotube chemistry: an update. *School Science Review* 81:37-48, 1999.
- Talbot C: Fullerene and nanotube chemistry: an update. *School Science Review* 81:37-48, 1999.
- Trpković A, Todorović-Marković B, Trajković V: Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Archives of Toxicology* 86:1809-1827, 2012.

- Unković N, Ljaljević Grbić M, Stupar M, Vukojević J, Janković V, Jović D, Đorđević A: Aspergilli response to benzalkonium chloride and novel-synthesized fullereneol / benzalkonium chloride nanocomposite. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA: A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* 2:263-277, 2009.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA: A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* 2: 263-277, 2009.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA: Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69:57-80, 2011.
- Vávrová J, Řezáčová M, Pejchal J: Fullerene nanoparticles and their anti-oxidative effects: a comparison to other radio protective agents. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE* 10: 1–8, 2012.
- Yabe K, Nakajima H: Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology* 64:745-755, 2004.
- Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T: Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂⁻ versus ¹O₂. *Journal of the American Chemical Society* 125:12803-12809, 2003.
- Yu J: Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 4:1024-1057, 2012.
- WEB 1: <https://www.chemistryworld.com/feature/harry-kroto-19392016/1010247.article> (pristupljeno 22.07.2020. u 14:20h)